

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพ-  
โอนิค หรือสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอล  
SELECTION OF MICROORGANISM WHICH PRODUCED 3-HYDROXY-  
PROPIONIC ACID OR 1,3-PROPANEDIOL FROM GLYCEROL



T142850

นางสาวกฤติยา

วงศ์พิมพ์

นางสาวพิมวสุญา

วงศ์ลา

นางสาวรัตนพร

โสบุญมา

ส.พ.

ก 277 ก

7507

เลขหมู่.....142850

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี.....30 พ.ค. 2559

b. 12779337

i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SELECTION OF MICROORGANISM WHICH PRODUCED 3-HYDROXY-  
PROPIONIC ACID OR 1,3-PROPANEDIOL FROM GLYCEROL



KRITIYA WONGPIM  
PHIMWASUYA WONGLA  
RATTANAPORN SOBOONMA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด-3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิก หรือสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากกลีเซอรอล

Selection of Microorganism which Produced 3-Hydroxypropionic Acid or 1,3-Propanediol from Glycerol

ชื่อนักศึกษา

นางสาวกฤติยา วงษ์พิมพ์ รหัสนักศึกษา 54051160  
นางสาวพิมพ์สุญา วงษ์ลา รหัสนักศึกษา 54051177  
นางสาวรัตนาพร โสบุญมา รหัสนักศึกษา 54051263

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

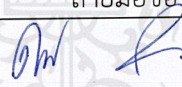
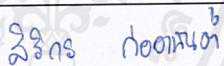
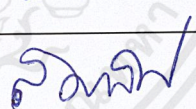
ปีการศึกษา

2557

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
อ.สิริกร ก่ออนันต์ กรรมการ	
อ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิก หรือสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากกลีเซอรอล  
Selection of Microorganism which Produced 3-Hydroxypropionic Acid or 1,3-Propanediol from Glycerol

ชื่อนักศึกษา

นางสาวกฤติยา วงษ์พิมพ์ รหัสนักศึกษา 54051160  
นางสาวพิมวสุญา วงษ์ลา รหัสนักศึกษา 54051177  
นางสาวรัตนพร โสบุญมา รหัสนักศึกษา 54051263

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2557

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.สมพิศ สอนโยธา

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอล โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งตัวอย่าง 23 แหล่ง พบว่าจากจุลินทรีย์ทั้งหมด 138 ไอโซเลทที่เจริญได้ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถสร้างโซนใส มีเพียง 57 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้ และในจำนวนนี้พบจุลินทรีย์ 11 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้มากกว่า 4 กรัมต่อลิตร และพบจุลินทรีย์ 11 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้มากกว่า 6 กรัมต่อลิตร โดยแหล่งดินที่เก็บจากบริเวณเกษตรกรรมสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้มากที่สุด จากนั้นได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้สูงและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันจำนวน 3 ไอโซเลทคือ CC2, CC7 และ CA5 มาทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ของไอโซเลท CC2 และ CC7 คือสูตร Rich medium ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ของไอโซเลท CA5 คือสูตร Mineral medium

**คำสำคัญ :** การคัดแยก กรด 3-hydroxypropionic กลีเซอรอล สาร 1,3-propanediol

<b>Title</b>	Selection of Microorganism which Produced 3-Hydroxypropionic Acid or 1,3-Propanediol from Glycerol		
<b>Students</b>	Miss Kritiya	Wongpim	Student ID 54051160
	Miss Phimwasuya	Wongpim	Student ID 54051177
	Miss Rattanapon	Soboonma	Student ID 54051263
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
<b>Department</b>	Biology		
<b>Academic Year</b>	2014		
<b>Advisor</b>	Dr.Somphit	Sornyotha	

### Abstract

This study aimed to isolate and select microorganisms with potential to produce 3-hydroxypropionic acid or 1,3-propanediol from glycerol. Twenty-three natural source samples were collected, cultivated and screened for this proposes. There are 138 isolates were able to grow and produce clear zone on medium containing glycerol as the carbon source. However, only 57 isolates were found with the ability to bioconvert the substrate to 3-hydroxypropionic acid or 1,3-propanediol. Among them, 11 isolates could produce 3-hydroxypropionic acid higher than 4 g/L and 11 isolates could produce 1,3-propanediol higher than 6 g/L. The results found that samples from Keakee-Rimrang turned out to be the most effective sources of 3-hydroxypropionic acid or 1,3-propanediol producing bacteria. In addition, the impact of different media on 3-hydroxypropionic acid production was investigated. Three isolates (CC2, CC7 and CA5) with different morphology and the ability to produce high concentrations of 3-hydroxypropionic acid were selected. After incubation, the best medium for 3-hydroxypropionic acid production of the isolate CC2 and CC7 was Rich medium. In the case of the isolate CA5, the highest of 3-hydroxypropionic acid production obtained by this strain were cultured on Mineral medium.

Keywords : Isolation, 3-hydroxypropionic acid, glycerol, 1,3-propanediol

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดและเสนอแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวก ตลอดจนคำปรึกษาในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ผู้มีพระคุณที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นที่กำลังใจตลอดระยะเวลาของการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องต่างๆ เป็นกำลังใจให้ตลอดมา และคอยให้ความช่วยเหลือในการทดลองด้านการยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่าง

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในงานที่เกี่ยวข้องด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงการพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

นางสาวกฤติยา

วงษ์พิมพ์

นางสาวพิมวสุญา

วงษ์ลา

นางสาวรัตนาวา

โสบุญมา

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ณ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	3
2.1 คุณสมบัติและความสำคัญของกรด 3-hydroxypropionic	3
2.1.1 คุณสมบัติของกรด 3-hydroxypropionic	3
2.1.2 กระบวนการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอล	5
2.1.2.1 การผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอล โดยวิถี CoA-dependent pathway	6
2.1.2.2 การผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-independent pathway	7
2.1.3 การประยุกต์ใช้กรด 3-hydroxypropionic	8
2.2 คุณสมบัติและความสำคัญของสาร 1,3-propanediol	8
2.2.1 คุณสมบัติของสาร 1,3-propanediol	8
2.2.2 กระบวนการผลิตสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอล	9
2.2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-propanediol	11
2.2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตสาร 1,3-propanediol	13
2.2.5 การประยุกต์ใช้สาร 1,3-Propanediol	14
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	16
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	16

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.1.1 สูตรอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์	16
3.1.1.1 สูตรอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. Mineral Salt medium (10X MS medium)	16
3.1.1.2 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.	16
3.1.1.3 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดแยกเชื้อ <i>Klebsiella</i> sp. M9 medium	16
3.1.1.4 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดแยก <i>Citrobacter</i> sp. Rich medium	16
3.1.2 สูตรอาหารสำหรับตรวจสอบการผลิตกรดโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	17
3.1.2.1 Mineral Salt medium (1X MS medium) สำหรับเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.	17
3.1.2.2 Rich medium สำหรับเชื้อ <i>Citrobacter</i> sp.	17
3.1.2.3 M9 medium สำหรับเชื้อ <i>Klebsiella</i> sp.	17
3.1.2.4 Mineral trace element สำหรับเชื้อ <i>Klebsiella</i> sp.	18
3.1.3 สูตรอาหารที่ใช้ตรวจสอบการผลิตกรดที่ได้ปริมาณสูงสุด	18
3.1.3.1 Minimal medium	18
3.1.3.2 Rich medium	18
3.1.3.3 Mineral medium	18
3.1.3.4 Bioreactor medium	19
3.1.3.5 Mineral trace element	19
3.1.4 สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี	19
3.1.4.1 Casein agar	19
3.1.4.2 Corn oil agar	20
3.1.4.3 Glucose broth	20
3.1.4.4 Lactose broth	20
3.1.4.5 Sucrose broth	20
3.1.4.6 Nutrient gelatin	20
3.1.4.7 Nutrient starch agar	21
3.1.4.8 TSI agar (Triple Sugar Iron Agar)	21
3.2 การคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์	21

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.3 การตรวจสอบการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	22
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC	22
3.5 การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	23
3.5.1 การศึกษาการสร้าง exoenzymes	23
3.5.2 การทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ	24
3.6 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol	25
3.7 การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	25
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล</b>	<b>28</b>
4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด	28
4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol เพื่อทำการศึกษาต่อ	41
4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	42
4.4 การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	46
4.4.1 การศึกษาการสร้าง exoenzymes	46
4.4.2 การทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ	48
4.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol	49
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	<b>53</b>
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	61

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารอนุพันธ์ของกรด 3-hydroxypropionic	4
2.2 คุณสมบัติของกลีเซอรอล	5
3.1 แสดงการบันทึกผลการทดลองของการเปลี่ยนแปลงใน TSI (Triple sugar iron agar)	24
4.1 แหล่งตัวอย่างที่สามารถตัดแยกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนไฮและลักษณะโคโลนี	29-33
4.2 ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic (3-HP) หรือสาร 1,3-propanediol (1,3-PDO) จากจุลินทรีย์ที่สร้างโซนไฮ	34-38
4.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ที่ตัดแยกเพื่อทำการศึกษาต่อ	41
4.4 แสดงลักษณะของโคโลนี รูปร่างและการจัดเรียงตัว การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และขนาดของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	45
4.5 แสดงการสร้าง exoenzymes จากจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก	46-47
4.6 แสดงการทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ จากจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก	48
4.7 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol	51

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรด 3-hydroxypropionic	3
2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรด 3-hydroxypropionic และสารตั้งต้นที่สามารถใช้ในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ทั้งทางชีวภาพและทางเคมี	4
2.3 วิธีเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-dependent และวิถี CoA-independent	6
2.4 วิธีการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอลของ <i>L. reuteri</i> โดยอาศัยยีน <i>dhaB</i> ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ glycerol dehydratase ยีน <i>pduP</i> , <i>pduL</i> และ <i>pduW</i> ทำหน้าที่เปลี่ยน 3-hydroxypropionaldehyde ไปเป็นกรด 3-hydroxypropionic และจำเป็นต้องใช้ NAD <sup>+</sup> และ ADP	7
2.5 ขั้นตอนการผลิตกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol	8
2.6 กระบวนการเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลในการผลิตสาร 1,3-propanediol ของ <i>Klebsiella pneumonia</i>	11
4.1 ตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์	28
4.2 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ของแต่ละตัวอย่างดิน	39
4.3 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic ที่ความเข้มข้นในช่วงต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า	40
4.4 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตสาร 1,3-propanediol ที่ความเข้มข้นในช่วงต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า	40
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X	43-44

## คำย่อ/สัญลักษณ์

3-HP	3-hydroxypropionic
1,3-PDO	1,3-propanediol
3-HPA	3-hydroxypropionaldehyde
1,2-PDO	1,2-propanediol
PEP	phosphoenolpyruvate
<i>K. pneumonia</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<i>K. planticola</i>	<i>Klebsiella planticola</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>
<i>S. enteric</i>	<i>Salmonella enteric</i>
<i>C. pasteurianum</i>	<i>Clostridium pasteurianum</i>
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>E. agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
pdu	propanediol utilization
PduP	propanol dehydrogenase CoA-dependent
	propionaldehyde dehydrogenase
PduL	phosphotransacylase
PduW	propionate kinase
GDHt	glycerol dehydratase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
DHA	dihydroxyacetone
G3P	glyceroldehyde 3-phosphate
PDOR	1,3-propanediol oxidoreductase
DHAK	dihydroxyacetone phosphate kinase
DHAP	dihydroxyacetone phosphate
PTT	Poly (trimethylene terephthalate)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
BA, CA, KA	ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินจากกระบี่
BB, CB, KB	ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินกล้วยทอด
BC, CC, KC	ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตึกรอกอิฐ
ND	ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการงาน

จากวิกฤติการณ์ด้านราคาน้ำมันปิโตรเลียมที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจึงทำให้ประเทศต่างๆ หันมาให้ความสำคัญกับพลังงานทดแทนมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปแบบของการผลิตไบโอดีเซลซึ่งส่งผลให้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีปริมาณสูงขึ้นตามกำลังการผลิตของไบโอดีเซลที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีการพัฒนากลยุทธ์ทางการผลิตโดยนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นสารที่มีมูลค่าสูง เช่น กรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตไบโอพลาสติก

กรด 3-hydroxypropionic ตัวย่อ 3-HP หรือ Lactic Ethylene Acid จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของกรดแลคติก (2-hydroxypropanoic acid) (Pina และคณะ, 2011) สูตรโมเลกุลของกรด 3-hydroxypropionic คือ  $C_3H_6O_3$  นอกจากนี้ โครงสร้างของสารยังประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบต้า ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้กรด 3-hydroxypropionic จึงมีความแข็งแรงทนทานและเป็นสารตัวแทนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย

สาร 1,3-propanediol ตัวย่อ 1,3-PDO เป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลเชิงเดี่ยว (monomer) มีสูตรเคมี  $C_3H_8O_2$  (Leasing และคณะ, 2011) สาร 1,3-propanediol เป็นสารโมโนเมอร์ที่สามารถใช้ในการผลิตโพลีเมอร์หรือพลาสติก เช่น โพลีเอสเตอร์ โพลีอีเทอร์ และโพลียูรีเทน การผลิตสาร 1,3-propanediol มี 2 วิธี (Leasing, และคณะ 2011) โดยวิธีแรกเป็นกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีจากสาร acrolene, propylene, ethylene ที่อุณหภูมิและความดันสูงและใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีราคาแพง วิธีที่สองเป็นกระบวนการทางชีวภาพโดยการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์เฉพาะในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นสาร เช่น 1,3-propanediol dehydrogenase หรือ 1,3-propanediol oxidoreductase, 3-hydroxypropionaldehyde reductase เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., และ *Bacillus* sp. อยู่ในกลุ่มที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol ได้โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้ในปริมาณสูงสุดโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อพัฒนาเป็นสารที่มีมูลค่าสูงและเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น พลาสติก ไฟเบอร์ และเรซิน เป็นต้น

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอล
- 1.2.2 เพื่อศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
- 1.2.3 เพื่อศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรด 3-hydroxy-

propionic หรือสาร 1,3-propanediol ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

### 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1.3.1 ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอล

1.3.2 ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้อาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.3 ทำการศึกษารูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัว และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกได้

1.3.4 ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol เช่น สูตรอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (สภาวะนิ่ง และเขย่า) เป็นต้น

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำผลิตภัณฑ์กรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ที่ได้จากการย่อยสลายกลีเซอรอลมาใช้ทดแทนผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมเพื่อนำไปผลิตเคมีภัณฑ์ต่างๆ

1.4.2 สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับกลีเซอรอล ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้

1.4.3 สามารถลดการใช้สารเคมีที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

1.4.4 อาจได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol

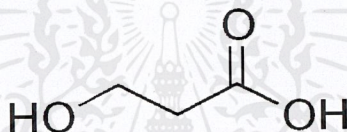
## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 คุณสมบัติและความสำคัญของกรด 3-hydroxypropionic

### 2.1.1 คุณสมบัติของกรด 3-hydroxypropionic

กรด 3-hydroxypropionic ตัวย่อ 3-HP หรือ Lactic Ethylene Acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของกรดแลคติก (2-hydroxypropanoic acid) (Pina และคณะ, 2011) มีสูตรโมเลกุลของกรด 3-hydroxypropionic คือ  $C_3H_6O_3$  และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 เป็นของเหลวหนืดที่มีค่าคงที่การแตกตัว (pKa) เท่ากับ 4.5 สามารถละลายได้ในเมทานอลและอีเทอร์ มีคุณสมบัติที่ไม่คงที่และไม่มียกเว้นเป็นองค์ประกอบ ซึ่งกลุ่มเมทิลนี้ส่งผลให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนน้อยลงนอกจากนี้โครงสร้างของสารยังประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบต้า ด้วยคุณสมบัตินี้จึงทำให้กรด 3-hydroxypropionic มีความแข็งแรงทนทานและเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย



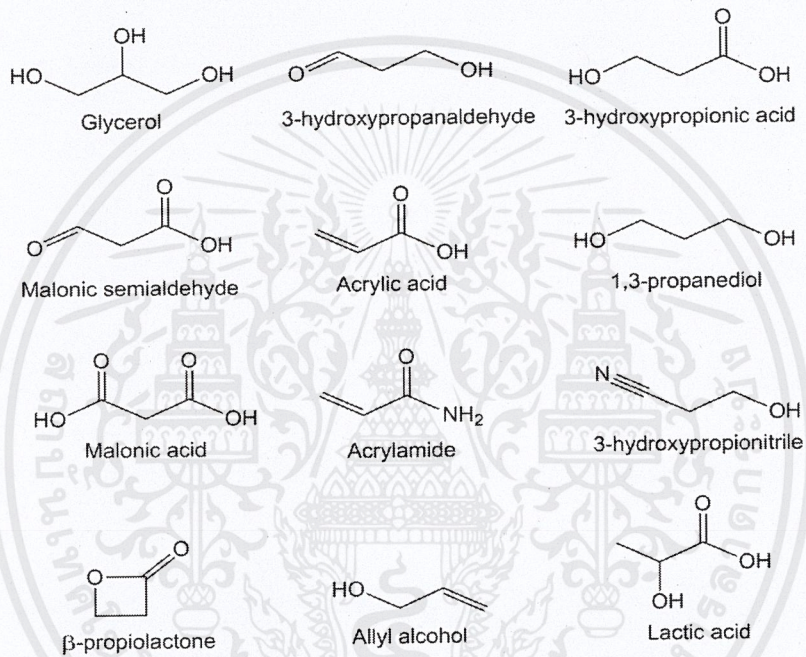
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรด 3-hydroxypropionic  
ที่มา : [https://en.wikipedia.org/wiki/3-hydroxypropionic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/3-hydroxypropionic_acid)

กรด 3-hydroxypropionic เป็นสารที่น่าสนใจในเชิงการค้าและจัดเป็นสารที่มีความสำคัญลำดับต้นๆของ Building Blocks จากทั้งหมด 12 ชนิด (Werpy และคณะ, 2004) เนื่องจากกรด 3-hydroxypropionic ประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบต้า จึงเหมาะที่จะใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้งานต่างๆ เช่น กรด acrylic, 1,3-propanediol (1,3-PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl, กรด 3-hydroxypropionic, malonic acid, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น สารอนุพันธ์ของกรด 3-hydroxypropionic เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สารเคลือบสารหล่อลื่นสารป้องกันการเกิดไฟฟ้าสถิตในสิ่งทอ วัสดุตกแต่งศัลยกรรม และสารประกอบในอุตสาหกรรมยา เป็นต้น (ตารางที่ 2.1) (Kumar และคณะ, 2013; Pina และคณะ, 2011; Zhang และคณะ, 2007) ในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic สามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ โดยสามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic มากมาย ได้แก่ กลีเซอรอล, สาร 1,3-propanediol (1,3-PDO), 3-hydroxypropanaldehyde (3-HPA), กรด malonic, กรด acrylic, กรด lactic, malonic semialdehyde, acrylamide, allyl alcohol, 3-hydroxypropionitrile และ propiolactone (รูปที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 สารอนุพันธ์ของกรด 3-hydroxypropionic

สารอนุพันธ์	กระบวนการผลิต	การนำไปประยุกต์ใช้
กรดอะคริลิก	ดีไฮเดรชัน	อุตสาหกรรมสิ่งทอ สีกระดาษกาวโพลีเมอร์
1, 3-โพรเพนไดออล	รีดักชัน	กาววัสดุสังเคราะห์ตกแต่งโพลีเอทิลีนเทเรฟทาเลต ผลิตภัณฑ์เส้นใยและสิ่งทอ
3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนอเลดีไฮด์	รีดักชัน	อาหารผลิตภัณฑ์เติมแต่งอาหารสัตว์ สารกันบูดในอุตสาหกรรมอาหาร

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรด 3-hydroxypropionic และสารตั้งต้นที่สามารถใช้ในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ทั้งทางชีวภาพและทางเคมี

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

จากการศึกษาการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ทางชีวภาพ พบว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างผลิตภัณฑ์กรด 3-hydroxypropionic ได้โดยใช้น้ำตาลกลูโคสหรือกลีเซอรอลอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Lactobacillus collinoides*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตกรด 3-hydroxypropionic พบว่ามีการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลูโคสโดยอาศัยเอนไซม์ reductase/acyl-CoA โดย *E. coli* แต่ยังคงมีราคาสูง (Raj และคณะ, 2008) ในขณะที่ยังไม่พบจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถสร้างกรด 3-hydroxypropionic จากกระบวนการหมักกลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพถึงแม้จะเป็นวิธีการที่ใช้ต้นทุนต่ำก็ตาม ดังนั้นการคัดแยกจุลินทรีย์หรือการพัฒนา

ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic นั้นจึงเริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญมากยิ่งขึ้น

### 2.1.2 กระบวนการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอล

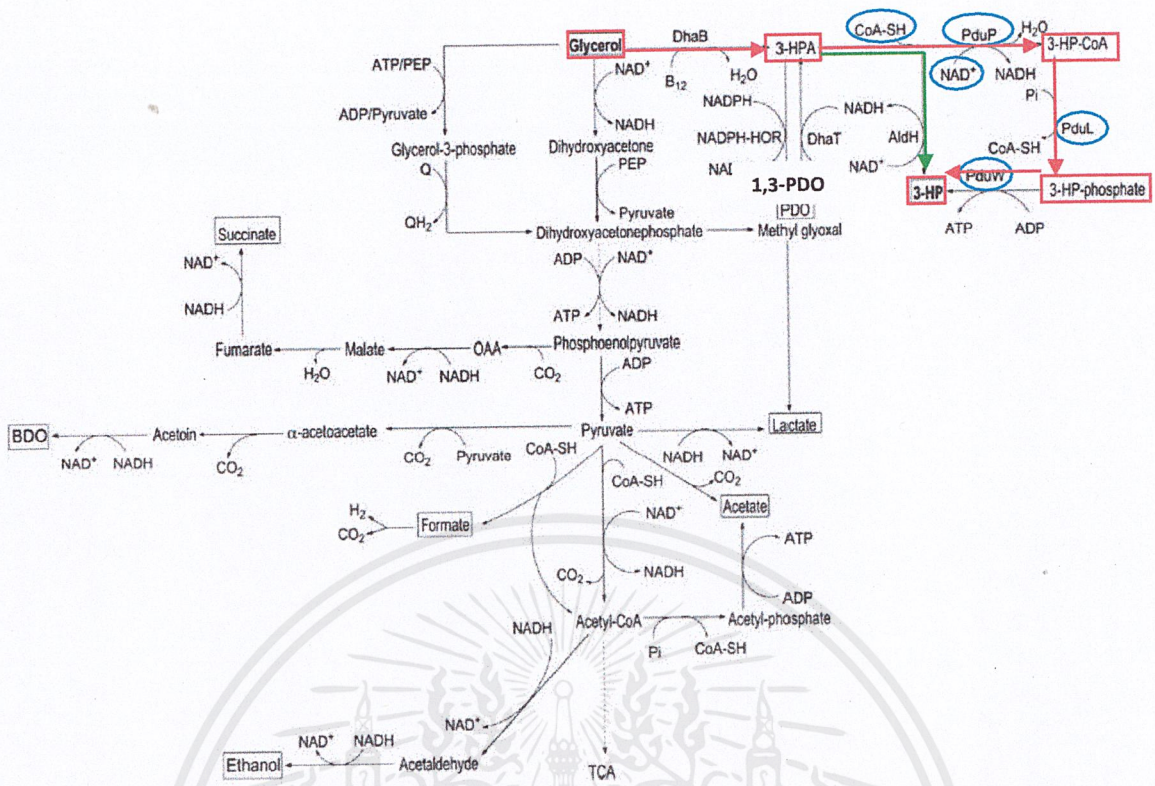
กลีเซอรอลเป็นสารเคมีที่มีปริมาณมากและสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าสูง โดยอาศัยการหมักของจุลินทรีย์ เช่น สาร 1,3-propanediol, dihydroxyacetoneethanol, succinate และกรด 3-hydroxypropionic เป็นต้น ในการศึกษาที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นแทนแหล่งน้ำตาล เช่น ซูโครส กลูโคส เนื่องจากกระบวนการหมักด้วยกลีเซอรอลสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่ากระบวนการหมักด้วยน้ำตาลทั่วไป ดังเช่น การเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอลไปเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) หรือ pyruvate โดยสารทั้งสองจะถูกผลิตขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส นอกจากนี้กลีเซอรอลยังผลิตได้โดยการหมักของจุลินทรีย์การสังเคราะห์จากสารเคมีและเป็นผลพลอยได้จากการผลิตสบู่และไบโอดีเซลจึงทำให้มีปริมาณมากและราคาถูกกว่ามากเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส จากข้อได้เปรียบเหล่านี้จึงทำให้กลีเซอรอลจัดเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตสารเคมีต่างๆ ผ่านกระบวนการหมักสำหรับคุณสมบัติต่างๆ ของกลีเซอรอลแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของกลีเซอรอล

สูตรโมเลกุล	$C_3H_8O_3$
ความหนาแน่น	1.26 g/cm <sup>3</sup>
จุดหลอมเหลว	17.8 °C
จุดเดือด	290 °C
มวลโมเลกุล	92.09382 g/mol
IUPAC ID	propane-1,2,3-triol
การละลาย	ละลายได้ในน้ำ

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่เจริญส่วนใหญ่ ได้แก่ *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Lactobacillus* จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้กลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยส่วนใหญ่แล้วสาร 1,3-propanediol จะเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตทั้ง 2 วิธี ดังจะได้กล่าวในหัวข้อที่ 2.2.2 ต่อไป และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *K. pneumonia*, *L. reuteri* และ *L. collinoides* สามารถสร้างกรด 3-hydroxypropionic ได้โดยการออกซิไดซ์ 3-hydroxypropionaldehyde พร้อมกับการสร้างสาร 1,3-propanediol (Garai-Ibabe และคณะ, 2008; Krauter และคณะ, 2012; Sobolov และคณะ, 1960; Talarico และคณะ, 1988) โดยการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอลประกอบไปด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ผ่าน 2 วิธี ได้แก่ CoA-dependent pathway และ CoA-independent pathway แสดงดังรูปที่ 2.3

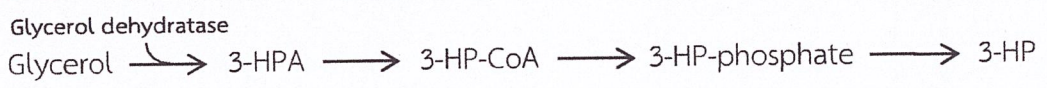
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 วิธีเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลโดยวิธี CoA-dependent และ วิธี CoA-independent  
ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

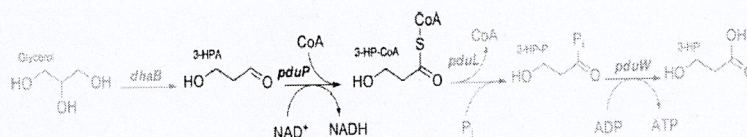
2.1.2.1 การผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอลโดยวิธี CoA-dependent pathway

การผลิตกรด 3-hydroxypropionic โดยวิธี CoA-dependent pathway สามารถพบได้ในจุลินทรีย์ *L. reuteri*, *L. collinoides*, *Salmonella enteric* และ *K. pneumonia* (Yasuda และคณะ, 2007) ใน *S. enteric* มีสาร 1,2-propanediol (1,2-PDO) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญและต้องอาศัยการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เรียกว่า propanediol utilization (*pdu*) ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในการย่อยสลายสาร 1,2-PDO โดย 1,2-PDO จะถูกเปลี่ยนไปเป็น propionaldehyde ด้วยเอนไซม์ dioldehydratase โดยมีวิตามิน B12 เป็น Coenzyme หลังจากนั้น propionaldehyde จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น propanol และกรด propionic ด้วยเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ propanol dehydrogenase CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP), เอนไซม์ phosphotransacylase (PduL) และเอนไซม์ propionate kinase (PduW) (Leal และคณะ, 2003; Liu และคณะ, 2007; Xue และคณะ, 2008) ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ในวิธี CoA-dependent pathway มีดังต่อไปนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากจะพบวิธีนี้ได้ใน *S. enteric* แล้วยังพบได้ใน *K. pneumonia* และ *L. Reuteri* อีกด้วย (Luo และคณะ, 2012) จากรูปที่ 2.4 แสดงการย่อยสลายกลีเซอรอลโดยอาศัยวิถี CoA-dependent pathway ของ *L. reuteri* พบว่าต้องผ่านสารตัวกลางคือ 3-HP-CoA โดยอาศัยเอนไซม์ CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP) ในกลุ่มยีน *pdu* operone เพื่อเปลี่ยน 3-HPA เป็น 3-HP-CoA



รูปที่ 2.4 วิธีการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอลของ *L.reuteri* โดยอาศัยยีน *dhaB* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ glycerol dehydratase ยีน *pduP*, *pduL* และ *pduW* ทำหน้าที่เปลี่ยน 3-hydroxypropionaldehyde ไปเป็นกรด 3-hydroxypropionic และจำเป็นต้องใช้  $\text{NAD}^+$  และ ADP

ที่มา : Ramin และคณะ, 2013

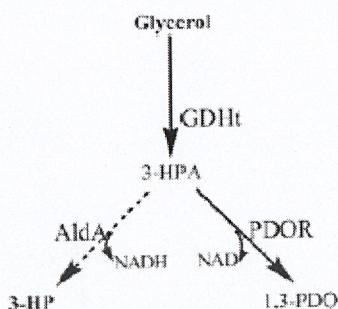
### 2.1.2.2 การผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-independent pathway

ปฏิกิริยาแรกของวิถี CoA-independent pathway คือการเปลี่ยน glycerol เป็น 3-hydroxypropionaldehyde โดยอาศัยเอนไซม์ glycerol dehydratase (GDHt) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถเกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์ dioldehydratase ได้เช่นกัน ซึ่งเอนไซม์ GDHt ใน pathway นี้อยู่ในรูป Coenzyme B12-dependent GDHt ยังไม่มีการนำไปใช้ในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic เพราะค่อนข้างไวต่อออกซิเจน เนื่องจากการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะการจำกัดอากาศ เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งได้แก่ เอนไซม์ aldehyde dehydrogenase (ALDH) ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันของ 3-hydroxypropionaldehyde ไปเป็นกรด 3-hydroxypropionic ซึ่งการทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ  $\text{NAD}^+$  ซึ่งสามารถถูกนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน จุลินทรีย์บางชนิด เช่น *K. pneumonia* และ *Lactobacillus* sp. ปฏิกิริยาที่สองพบเอนไซม์ ALDHs แต่ยังคงเกิดกิจกรรมการทำงานไม่สูงมากนัก ดังนั้นการแสดงออกของ ALDHs สูงจึงมีความจำเป็นต่อประสิทธิภาพในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic จากกลีเซอรอล โดยวิถี CoA-independent กระบวนการผลิตกรด 3-hydroxypropionic (3-HP) และสาร 1,3-propanediol (1,3-PDO) พบว่ามีการสังเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยาสองขั้นตอน (รูปที่ 2.5) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ glycerol dehydratase (GDHt) ทำหน้าที่เปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde

ขั้นตอนที่ 2 3-hydroxypropionaldehyde จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรด 3-hydroxypropio-

nic และสาร 1,3-propanediol ในกระบวนการหมักกลีเซอรอลและไม่มี การเติมน้ำตาลกลูโคสแต่ การสร้างสาร 1,3-propanediol จะสูงขึ้นและกรด 3-hydroxypropionic จะต่ำลงเมื่อมีการเติม กลูโคสลงไป (Kumar และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการผลิตกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol

ที่มา : Zhu J-G และคณะ, 2009

### 2.1.2.3 การประยุกต์ใช้กรด 3-hydroxypropionic

กรด 3-hydroxypropionic จัดเป็นสารที่มีความสำคัญลำดับต้นๆ ของสาร Building Blocks ทั้งหมด 12 ชนิด ที่สามารถผลิตได้จากการเปลี่ยนแปลงของชีวมวลโดยกรด 3-hydroxypropionic สามารถใช้เป็นส่วนตัวกลางเพื่อการสังเคราะห์สารเคมีต่างๆ เช่น กรด acrylic, สาร 1,3-propanediol (1,3-PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-hydroxypropionic, กรด malonic, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น กรด 3-hydroxypropionic ยังสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์ที่เคลือบด้วยโพลีเมอร์ ผลิตภัณฑ์หล่อลื่น และสารป้องกันไฟฟ้าสถิตสำหรับ สิ่งทอ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นส่วนตั้งต้นสำหรับการผลิต propiolactone, polyesters และ oligomers โดยอาศัยปฏิกิริยา cyclization และปฏิกิริยา polymerization โดยเฉพาะโพลีเมอร์ที่ผลิตได้จากการกลั่นตัวของกรด 3-hydroxypropionic ที่เรียกว่า poly 3-hydroxypropionic acid สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับการผ่าตัดและยาซึ่งถือว่าเป็นวัสดุใหม่ที่มีเริ่มมีการพัฒนาขึ้นในวงการแพทย์ ซึ่งจุดเด่นของกรด poly 3-hydroxypropionic คือสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและเป็นโพลีเมอร์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้แทนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปิโตรเลียม (Jiang และคณะ, 2009)

## 2.2 คุณสมบัติและความสำคัญของสาร 1,3-propanediol

### 2.2.1 คุณสมบัติของสาร 1,3-propanediol

สาร 1,3-propanediol เป็นสารโมเลกุลเชิงเดี่ยว (Monomer) มีสูตรโมเลกุล  $C_3H_8O_2$  น้ำหนักโมเลกุล 76.10 กรัมต่อโมล ซึ่งเป็นสารที่มีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์โพลีเอสเตอร์ (เช่น polyethylene terephthalate, polyurethanes)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

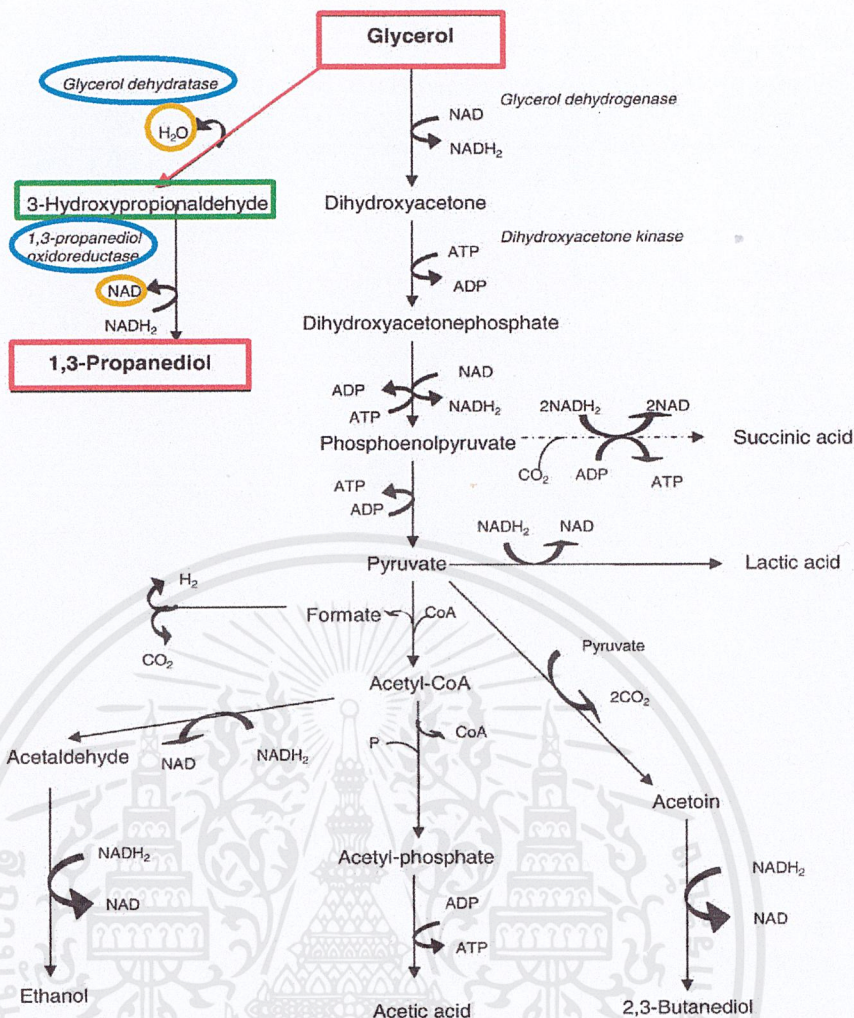
สารหล่อลื่น (lubricant) เป็นตัวทำละลาย (solvent) หรือนำมาผลิตเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ โดยสามารถใช้กลีเซอรอลดิบซึ่งมีราคาถูกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสาร 1,3-propanediol การผลิตสาร 1,3-propanediol เกิดจากการแตกตัวของไขมันจากธรรมชาติซึ่งจะใช้เป็นแหล่งอาหารของ จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. และ *Clostridium* sp. เป็นต้น (biodegradable plastic; พิสมัย เจนวนิชปัญญกุล, 2549)

สำหรับกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพของการผลิตสาร 1,3-propanediol จากชีวมวล หรือวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาทดแทนกระบวนการสังเคราะห์สารเคมีแบบดั้งเดิมคือ กระบวนการเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-propanediol แต่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักนี้ยังไม่สามารถกล่าวได้ว่ามีประสิทธิภาพมากพอ เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดโรคได้ ดังนั้นการผลิตสาร 1,3-propanediol โดยกระบวนการทางชีวภาพยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในเรื่องของการผลิตเชื้อจุลินทรีย์และวิถีเมตาบอลิซึมที่มีส่วนในการผลิตสาร 1,3-propanediol (Werkman และ Gillen, 1932) ในขณะที่การผลิตสาร 1,3-propanediol โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีนั้นสามารถเกิดได้ 2 ปฏิกิริยาที่ต่างกันคือ ปฏิกิริยา hydration ของ acrolein และปฏิกิริยา hydroformylation ของ ethylene oxide (Cameron และคณะ, 1998; Hao และคณะ, 2006; Yang และคณะ, 2007) การสังเคราะห์ทางเคมีต้องอาศัยอุณหภูมิสูง ความดันสูง และตัวเร่งปฏิกิริยา (Lin และคณะ, 2005) และเกิดสารตัวกลางที่เป็นพิษ (Raynaud และคณะ, 2003; Gonza lez Pajuelo และคณะ, 2004, 2005a) ดังนั้นการสังเคราะห์ทางเคมีจึงมีต้นทุนที่แพงและมีความเป็นพิษ นอกจากนี้ยังมีปริมาณการผลิตสาร 1,3-propanediol ต่ำ (Deckwer, 1995) ดังนั้นการสังเคราะห์ทางเทคโนโลยีชีวภาพของสาร 1,3-propanediol จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Hao และคณะ, 2006)

### 2.2.2 กระบวนการผลิตสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอล

ในการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลในทางการค้ามีจำนวนเพิ่มขึ้นในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของผลิตภัณฑ์พลอยได้จำนวนมากในการผลิตไบโอดีเซล โดยกลีเซอรอลสามารถถูกเปลี่ยนให้เป็นสาร 1,3-propanediol ซึ่งไม่เพียงเฉพาะจะสามารถใช้ประโยชน์ได้จากผลิตภัณฑ์สุดท้ายแต่ยังเป็นสารประกอบที่มีมูลค่าสำหรับการผลิตโพลีเมอร์ ซึ่งการผลิตสาร 1,3-propanediol เกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การสังเคราะห์ขึ้นจากทางเคมี เช่น acrolein และ propylene หรือ ethylene เป็นกระบวนการที่ต้องทำที่อุณหภูมิและความดันสูง ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีราคาสูง โดยการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นสาร 1,3-propanediol โดยจุลินทรีย์จะเกิดในปริมาณที่ไม่เป็นสัดส่วน ในอีกด้านหนึ่งกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) โดยเอนไซม์ glycerol dehydratase ตามด้วยปฏิกิริยา dehydrogenated ได้เป็นสาร 1,3-propanediol จาก NADH<sub>2</sub> ในอีกด้านหนึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงผ่าน dihydroxyacetone (DHA) เป็น glyceroldehyde 3-phosphate (G3P) และเปลี่ยนต่อเป็นไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งจะก่อให้เกิด

เป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด คือ อะซิเตต (acetate), แลคเตต (lactate), บิวไทเรต (butyrate), เอทานอล (ethanol), คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) และ ไฮโดรเจน (H<sub>2</sub>), โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากการรีดิวซ์ NADH<sub>2</sub> หากไม่มีการโยกย้ายไปถึงตัวรับอิเล็กตรอนภายนอกจะส่งผลให้เกิดการออกซิไดซ์และชักนำให้เกิดการผลิตสาร 1,3-Propanediol ตามมา (Saxena และคณะ, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 วิธีที่ 2 การผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การหมักน้ำตาลหรือกลีเซอรอลโดยจุลินทรีย์ มีการรายงานมากมายเกี่ยวกับการผลิตสาร 1,3-propanediol โดยอาศัยกระบวนการหมักและมีการใช้ทั้งกลีเซอรอลบริสุทธิ์หรือกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ (Cameron และคณะ, 1998; Hao และคณะ, 2006; Yang และคณะ, 2007) สาร 1,3-Propanediol เป็นสารสำคัญตัวหนึ่งในการผลิตเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Enterobacter radicincitans* ซึ่งคัดแยกจากชีวมวลหรือวัสดุเศษเหลือจากธรรมชาติ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกลีเซอรอลดิบและได้เพาะเลี้ยงทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic condition) (biodegradable plastic; พิสมัย เจนวนิชปัญญกุล, 2549) การผลิตสาร 1,3-propanediol ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยการหมักกลีเซอรอลนั้น ซึ่งกลีเซอรอลถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร 1,3-propanediol โดยอาศัยตัวกลางของวิถี oxidative ในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งมีผลพลอยได้ที่มีประสิทธิภาพคือ NADH<sub>2</sub> นอกจากนี้ยังสามารถผลิต คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>), ไฮโดรเจน (H<sub>2</sub>), อะซิเตต (acetate), บิวไทเรต (butyrate), เอทานอล (ethanol), บิวทานอล (butanol) และ 2,3-บิวเทนไดออล (2,3-butanediol) แต่ในการผลิตแลคเตต (lactate) และซัคซิเนท (saccinate) นั้นจะเกิดขึ้นในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งซึ่งถูกกำหนดโดย NADH<sub>2</sub> ซึ่ง NADH<sub>2</sub> ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในวิถี oxidative ดังแสดงในรูปที่ 2.6 และขึ้นอยู่กับการใช้จุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาวะของกระบวนการผลิต เช่น ชนิดของการหมัก สารตั้งต้นที่มากพอและการยับยั้งที่หลากหลาย เป็นต้น (Biebl และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.6 กระบวนการเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลในการผลิตสาร 1,3-propanediol ของ *Klebsiella pneumonia*  
ที่มา : Saxena และคณะ, 2009

### 2.2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-propanediol

การผลิตสาร 1,3-propanediol โดยใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบตั้งต้น จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-propanediol ได้ คือ *Enterobacteria* อยู่ในจีนัส *Klebsiella*, *Clostridia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Lactobacilli* ซึ่งสายพันธุ์ของ *Clostridial* หลายสายพันธุ์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum* ซึ่งจะสามารถเจริญบนกลีเซอรอลและสามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้ จุลินทรีย์ที่เจริญภายใต้ภาวะออกซิเจนต่ำ เช่น *Klebsiella pneumonia* และ *Citrobacter freundii* ยังพบว่ามีเหมาะสมในการผลิตสาร 1,3-propanediol แม้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศจะทำได้ง่ายกว่าแต่สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค จึงต้องระมัดระวังด้านความปลอดภัยในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยง ขณะที่ *K. pneumoniae* เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งในจีนัสเดียวกันที่ใช้เพื่อการผลิตสาร 1,3-propanediol เช่น *K. oxytoca* และ *K. planticola* และสำหรับ *C. butyricum* และ *K. pneumoniae* สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งไฮโดรเจนในการผลิตสาร 1,3-propanediol ได้ดี จึงถูกพิจารณาว่าเป็นผู้ผลิตตามธรรมชาติที่ดีที่สุดและน่าสนใจเนื่องจากมีความคงทนต่อสับสเตรต ให้ผลผลิต และมีความสามารถในการผลิตที่ดี (Saxena และคณะ, 2009)

จากรายงานวิจัยของ Himmi และคณะ (1999) ที่ใช้การหมักแบบแบชร่วมกับกลีเซอรอลหรือกลีเซอรินเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับอุตสาหกรรมแสดงให้เห็นว่า การหมักกลีเซอรอลของ *K. pneumoniae* DSM 2026 (NCTC 418) โดยใช้กลีเซอรอล 120 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นของการผลิตสาร 1,3-propanediol อยู่ระหว่าง 1.68 ถึง 2.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ค่าผลได้ของการผลิตสาร 1,3-propanediol เป็น 0.53 ถึง 0.56 โมลต่อโมล ตามลำดับ

Barbirato และคณะ (1998) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ชีวภาพของการผลิตสาร 1,3-propanediol ที่ได้จาก *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. agglomerans* และ *C. butyricum* มีการตรวจสอบโดยใช้การหมักแบบแบชและเปรียบเทียบการใช้กลีเซอรอลที่ปริมาณต่ำและสูง พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบชโดยใช้ *C. butyricum* ร่วมกับกลีเซอรอลในทางอุตสาหกรรม ซึ่งใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลสุดท้ายเท่ากับ 112 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตของสาร 1,3-propanediol เท่ากับ 63.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าผลได้เป็น 0.69 โมลต่อโมล เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการหมักจากในบรรดาจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด โดยเลือก *C. butyricum* มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในกลีเซอรอลที่พบในน้ำเสียของอุตสาหกรรม การหมักแบบต่อเนื่องยังมีความสามารถในการผลิตที่สูงกว่าแต่ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร 1,3-propanediol จะมีค่าต่ำ ขณะที่การหมักแบบกึ่งแบชจะให้ผลผลิตของสาร 1,3-propanediol สูงสุดที่สูงกว่า *C. butyricum* E5

จากรายงานวิจัยของ Petitdemange และคณะ (1995) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ *C. butyricum* E5 ในการผลิตสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอล ซึ่งจากการหมักแบบกึ่งแบชโดยใช้กลีเซอรอล 109 กรัมต่อลิตร พบปริมาณการผลิตสาร 1,3-propanediol ที่ 58 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.0 และจุลินทรีย์สายพันธุ์ *K. pneumoniae* พบการผลิตสาร 1,3-propanediol เท่ากับ 38.1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 การเพาะเลี้ยงแบบแบชและแบบต่อเนื่องใน *C. butyricum* สายพันธุ์ใหม่ยังถูกนำมาใช้กับกลีเซอรอลในระดับอุตสาหกรรม โดยการเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบจะให้ผลผลิตของสาร 1,3-propanediol ที่ 0.55 กรัมต่อกรัม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะให้ความเข้มข้นของสาร 1,3-propanediol สูงสุดเท่ากับ 35-48 กรัมต่อลิตร

#### 2.2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตสาร 1,3-propanediol

ในปี 1980 ได้มีการศึกษาถึงกลไกการเผาผลาญและกลไกของเอนไซม์ในการผลิตสาร 1,3-propanediol จากข้อมูลทางด้านชีวเคมีของการผลิตสาร 1,3-propanediol อธิบายได้ว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลคือ เอนไซม์ dehydratase (GDHt), เอนไซม์ 1,3-propanediol oxidoreductase (PDOR), เอนไซม์ glycerol dehydrogenase (GDH) และเอนไซม์ dihydroxyacetone phosphate kinase (DHAK) กระบวนการย่อยสลายกลีเซอรอลเกี่ยวข้องกับ 2 วิธีคือ วิธี Reductive และวิธี Oxidative โดยวิธี Reductive มีการใช้เอนไซม์ในสองขั้นตอน ซึ่งเอนไซม์ตัวแรกคือ วิตามิน B<sub>12</sub>-dependent (GDHt) จะทำหน้าที่ในการย้ายโมเลกุลของน้ำจากกลีเซอรอลไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) จากนั้นจะถูกรีดิวซ์เป็นสาร 1,3-propanediol เอนไซม์ตัวที่สองคือ เอนไซม์ 1,3-propanediol oxidoreductase จะทำให้ได้ NADH เชื่อมจับกับ PDOR ในวิธี Oxidative กลีเซอรอลจะเกิดการดีไฮโดรจีเนตได้เป็นโมเลกุลของ dihydroxyacetone (DHA) โดย NAD<sup>+</sup> จะเชื่อมจับกับ GDH ได้เป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) โดย ATP-dependent DHAK ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เอนไซม์ตัวแรกของการหมักกลีเซอรอลหรือ GDHt จะใช้สารตั้งต้นเป็น อะดีโนซิลโคบาลาไมด์ (adenosylcobalamine) ซึ่งจะทำให้หน้าที่กำจัดน้ำออกจากกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนเป็น 3-HPA (เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สาร 1,3-propanediol) จากนั้น GDHt จะถูกยับยั้งโดยกลีเซอรอล เนื่องจากไม่สามารถเกิดการแตกตัวของพันธะ Cobalt-Carbon (Co-C) ของโคเอนไซม์ B<sub>12</sub> ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ 5' ดีออกซีอะดีโนซีน (5'-deoxyadenosine) และ cobalamin การที่เอนไซม์ไม่สามารถผันกลับได้เนื่องจากในส่วนของไฮโดรเจนของเอนไซม์ของ GDHt ยังไม่สามารถทำงานได้อย่างเกี่ยวข้องกับการจับตัวของโคเอนไซม์จากการขาดออกซิเจนของสับสเตรตและการเปลี่ยนแปลงของ hydroxocobalamin (OH-Cbl) ที่ไม่มีการทำงาน เนื่องจากปฏิกิริยาของพันธะ Cobalt-Carbon (Co-C) ในโคเอนไซม์กับออกซิเจนและเอนไซม์ GDHt ในเซลล์ของ *K. pneumonia* ในทำนองเดียวกันเอนไซม์ตัวที่สองในการเมตาบอลิซึมกลีเซอรอลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร 1,3-propanediol คือเอนไซม์ PDOR โดยจะมีการย้ายส่วนที่ผ่านการรีดิวซ์จาก NADH ได้เป็น 3-HPA และมีผลิตภัณฑ์เป็นสาร 1,3-propanediol สำหรับเอนไซม์ PDOR สามารถสกัดได้จาก *L. brevis* และ *L. buchneri* ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกสังเคราะห์ขึ้นระหว่างการหมักกลีเซอรอลและน้ำตาล โดยเอนไซม์ที่คัดแยกได้จากจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกันกับ *K. pneumonia* แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ได้จาก *L. reuteri* กับเอนไซม์จาก lactobacillus ชนิดอื่นๆจะมีความแตกต่างกัน ได้มีการทดสอบการหมักกลูโคสของ lactobacilli ร่วมกับกลีเซอรอลและการผลิตสาร 1,3-propanediol ซึ่งเอนไซม์ PDOR จะสามารถสกัดได้จาก *E. agglomerans* CNCM1210 การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7-8 และเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดย NAD<sup>+</sup> สำหรับเอนไซม์ PDOR ที่สกัดได้จาก *C. freundii* จากการทดสอบพบว่าเอนไซม์ dehydrogenase ซึ่งต้องการสับสเตรตคือ 3-HPA โดยค่าความเข้มข้นของเอนไซม์สำหรับ 3-HPA และ NADH มีค่าอยู่ที่ 140 และ 33 ไมโครโมล ตามลำดับ เอนไซม์ยังถูกยับยั้งโดยการจับของไอออนบวก เอนไซม์ PDOR ยังสามารถสกัดจาก *C. butyricum* E5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไป และมีสมบัติคล้ายกับเอนไซม์ที่ได้จาก *K. pneumonia* นอกจากนี้กลีเซอรอลยังสามารถได้จากการหมักน้ำตาล พบว่ากลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากการเกิดปฏิกิริยา sponification ของไขมัน กระบวนการผลิตเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์และการผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการเปลี่ยนแปลงพืชเศรษฐกิจ เช่น เชื้อเพลิงอย่าง

ไดเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) จากน้ำมัน colza หรือเอทานอลที่ผลิตจากธัญพืช บั๊ก หรืออ้อย การสังเคราะห์เชื้อเพลิงทางชีวภาพเหล่านี้จะได้ผลพลอยได้เป็นกลีเซอรอล ซึ่งจะพบประมาณร้อยละ 10 และ 6 ของการผลิตไดเอสเทอร์และเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลมีส่วนสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เนื่องจากมีปริมาณกลีเซอรอลดิบที่เพิ่มขึ้น ขณะที่การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสารจากจุลินทรีย์ โดยใช้กลีเซอรอลมีจำนวนลดลง กลีเซอรอลที่ยังมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการผลิตน้ำมันดิบในอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง (Saxena และคณะ, 2009)

### 2.2.5 การประยุกต์ใช้สาร 1,3-Propanediol

ปัจจุบันได้มีความต้องการโพลีเอสเตอร์ในกลุ่มสารเคมีในปริมาณมาก โดยมีการประยุกต์ใช้สาร 1,3-propanediol เป็นโมโนเมอร์เพื่อผลิตโพลีเอสเตอร์ชนิดใหม่ ๆ และพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ จึงทำให้มีความต้องการสารดังกล่าวเป็นอย่างมากในตลาด เพื่อการผลิตสารเคมีเหล่านี้ในปริมาณมาก โดยอาศัยวิถีทางชีวภาพในการผลิต ข้อได้เปรียบหลักของโพลีเอสเตอร์ที่สามารถย่อยสลายได้เมื่อเปรียบเทียบกับโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate) หรือโพลีแลกไทด์ (polylactides) คือสมบัติทางกายภาพของโพลีเอสเตอร์ที่สามารถปรับเปลี่ยนเพื่อตอบสนองความต้องการในกระบวนการแปรรูปและเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ทำจากพลาสติก

ในปี 1995 บริษัท Shell ประกาศทำการค้าสารโพลีเอสเตอร์ชนิดใหม่ 'Corterra™ PTT' ซึ่งผลิตจากกรดเทเรพทาสิกและสาร 1,3-propanediol โพลีเมอร์ชนิดนี้คือโพลีเอสเตอร์ชนิดอะโรมาติกที่ทำจากกระบวนการโพลีคอนเดนเซชัน (polycondensation) PPT คือสารตัวแรกที่ถูกสังเคราะห์โดย Whinfield และ Dickson ของบริษัทหมึกพิมพ์ (Caligo Printing Ink) โดย PPT มีสมบัติที่โดดเด่นคือ มีความสามารถในการคืนสภาพได้ดี (resilience) ทนทานต่อการดัดสีได้ดี กระบวนการผลิตยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม PPT ยังมีศักยภาพในการใช้เพื่อผลิตพรม สิ่งทอ ฟิล์ม และบรรจุภัณฑ์ ทั้งนี้บริษัท Shell สามารถผลิต สาร 1,3-propanediol โดยวิธีทางเคมีและยังมีในเชิงพาณิชย์โดยอาศัยปฏิกิริยา hydroformylation ของ ethylene ออกไซด์กับคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน ต่อมา บริษัท DuPont ได้ทำการผลิตในลอน ซึ่งเป็นการพัฒนาโพลีเมอร์จาก สาร 1,3-propanediol เป็นเวลาหลายปี ทำให้ได้โพลีเมอร์รูปแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมีความยืดหยุ่น สามารถคืนสภาพและมีความนุ่ม นอกจากนี้ยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันของพีช จากบริษัท DuPont ใน Decatur รัฐอิลลินอยด์ (ประเทศสหรัฐอเมริกา) นับว่าเป็นกระบวนการผลิตสาร 1,3-propanediol จากน้ำตาลข้าวโพดที่ประสบความสำเร็จ โดยโพลีเมอร์จากข้าวโพดเหล่านี้เรียกว่า Sorona™ คือโพลีเมอร์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีการปรับปรุงให้ดีขึ้น ซึ่งมีประโยชน์ในด้านความนุ่ม ความสามารถในการคืนตัวจากการยืดดึง ให้สีสดใส และทนต่อแรงดึง โดย บริษัท DuPont และผู้ร่วมพัฒนาของ Genencor ได้ใช้ความพยายามกว่าเจ็ดปีเพื่อพัฒนาการย่อยทางชีวภาพซึ่งช่วยให้เกิดการหมักและการผลิตสาร 1,3-propanediol

ในปี 2007 บริษัท DuPont และบริษัท Tate-Lyle จึงได้ร่วมกันพัฒนากระบวนการผลิตในเชิงพาณิชย์สำหรับผลิตสาร 1,3-propanediol ซึ่งบริษัท DuPont มีความเชี่ยวชาญทางด้านวิศวะ-

กรรมกรย่อยทางชีวภาพและกระบวนการผลิตโพลีเมอร์ ขณะที่บริษัท Tate-Lyle มีความเชี่ยวชาญทางด้านกรหมักในเชิงพาณิชย์และกระบวนการผลิตคาร์โบไฮเดรต โดยสาร 1,3-propanediol ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตโพลีเมอร์สำหรับซีปนาวูร์ที่มีลักษณะโปร่งใส ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการช่วยชีวิตและต่อสู้ในสงคราม โดยสามารถปรับแต่งองค์ประกอบเพื่อเพิ่มคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น สมบัติการส่องผ่านของแสง ทนต่อแรงกระแทกและมีความเสถียรต่อรังสียูวี และยังพบคุณสมบัติที่โดดเด่นของโคโพลีเมอร์เอสเทอร์ จากส่วนประกอบของ 2,2,4,4-tetramethyl-1,3-cyclobutanediol กับสาร 1,3-propanediol และ dimethyl terephthalate โดยโพลีเมอร์ชนิดนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการผลิตเลนส์แก้วสำหรับสายตา แก้วเฮลิคอน และกระจกสำหรับผลิตอาวุธ ในปี 1951 สาร 1,3-propanediol จัดเป็นสารตัวแรกที่รู้จักในชื่อของยากล่อมประสาทโพรเพนไดออล (propanediol tranquilizer) สาร 1,3-propanediol ยังอาจถูกใช้เป็นสารทางชีวภาพอย่างเช่น PCT-3015 โดยเป็นสารทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงแต่ราคาต่ำ

นอกจากนี้ 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol ยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมสารทางชีวภาพสำหรับป้องกันการปนเปื้อนทางชีวภาพในพื้นที่ต่าง ๆ เช่น แหล่งน้ำหมุนเวียนในระบบทำความเย็น และส่วนอุปกรณ์ควบแน่นในกระบวนการระเหย ในแอร์และระบบทำความเย็น อีกทั้งยังสามารถใช้ปรับปรุงสมบัติต่าง ๆ สำหรับตัวทำละลาย ความสามารถในการยึดเกาะ ลามิเนต เรซิน สารลดแรงตึงผิวและเครื่องสำอาง สารดังกล่าวยังถูกใช้ในการถนอมอาหารสำหรับผลิตภัณฑ์สำหรับผู้บริโภคในครัวเรือนและสถาบันต่าง ๆ เช่น เป็นสารป้องกันการติดเชื้อในอุตสาหกรรมและเป็นสารช่วยในการรักษาความสดใหม่สำหรับดอกไม้ตัดก้าน เป็นต้น (Saxena และคณะ, 2009)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 3.1.1 สูตรอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1.1 สูตรอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. Mineral Salt medium (10X MS medium) (Bokvajova และคณะ, 1994)

NaNO <sub>3</sub>	8	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.8	กรัม
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.08	กรัม
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.08	กรัม
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

3.1.1.2 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. (Bokvajova และคณะ, 1994)

Mineral Salt medium (10X MS medium)	200	มิลลิลิตร
Glycerol	30	กรัม
Agar	20	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

3.1.1.3 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดแยกเชื้อ *Klebsiella* sp. M9 medium (Arasu และคณะ, 2011 )

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	1.0	กรัม
Yeast Extract	1.0	กรัม
Glycerol	30	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	10	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.1.4 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดแยก *Citrobacter* sp. Rich medium (Drozdzyńska และคณะ, 2014)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	5	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.4	กรัม

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.004	กรัม
Yeast Extract	2	กรัม
Bactopeptone	2.5	กรัม
Meat Extract	1.5	กรัม
Glycerol	30	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	10	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.2 สูตรอาหารสำหรับตรวจสอบการผลิตกรดโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

3.1.2.1 Mineral Salt medium (1X MS medium) สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. (Bokvajova และคณะ, 1994)

Mineral Salt medium (10X MS medium)	200	มิลลิลิตร
Glycerol	30	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

3.1.2.2 Rich medium สำหรับเชื้อ *Citrobacter* sp. (Drozdzyńska และคณะ, 2014)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	5	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.4	กรัม
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.004	กรัม
Yeast Extract	2	กรัม
Bactopeptone	2.5	กรัม
Meat Extract	1.5	กรัม
Glycerol	30	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.2.3 M9 medium สำหรับเชื้อ *Klebsiella* sp. (Arasu และคณะ, 2011)

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	1.0	กรัม
Yeast Extract	1.0	กรัม
Glycerol	30	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.2.4 Mineral trace element สำหรับเชื้อ *Klebsiella* sp. (Huang และ คณະ, 2013)

glycerol	30	กรัม
yeast extract	3	กรัม
citric acid	0.42	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.6	กรัม
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5.4	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
trace elements solution	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.3 สูตรอาหารที่ใช้ตรวจสอบการผลิตกรดที่ได้ปริมาณสูงสุด

3.1.3.1 Minimal medium (Drozdzyńska และคณະ, 2014)

Glycerol	22.5	กรัม
Glucose	7.5	กรัม
Casein peptone	2	กรัม
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0085	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.3.2 Rich medium (Drozdzyńska และคณະ, 2014)

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.004	กรัม
Yeast Extract	2	กรัม
Bactopeptone	2.5	กรัม
Meat Extract	1.5	กรัม
Glycerol	30	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3.1.3.3 Mineral medium (Drozdzyńska และคณະ, 2014)

Glycerol	30	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	14	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.0119	กรัม
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Cystein-HCL	0.2	กรัม

#### 3.1.3.4 Bioreactor medium (Drozdzyńska และคณะ, 2014)

Glycerol	30	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.4	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.4	กรัม
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.004	กรัม
yeast extract	2	กรัม
bactopeptone	2.5	กรัม
meat extract	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

#### 3.1.3.5 Mineral trace element (Huang และคณะ, 2013 )

glycerol	30	กรัม
yeast extract	3	กรัม
citric acid	0.42	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6	กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	5.4	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัม
trace elements solution	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

### 3.1.4 สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

#### 3.1.4.1 Casein agar (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Sodium caseinate	20	กรัม
Glucose	1	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
FeSO <sub>4</sub>	trace	
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.0

## 3.1.4.2 Corn oil agar (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

1. ต้มส่วนผสมเพื่อให้ส่วนผสมละลาย ปรับ pH เป็น 7.8 ด้วย 1N NaOH
2. เติม Victoria blue B (1 : 1500 ในน้ำ) 100 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำมันพืช (Corn oil)
4. ผสมให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

## 3.1.4.3 Glucose broth (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

## 3.1.4.4 Lactose broth (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

## 3.1.4.5 Sucrose broth (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
sucrose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

## 3.1.4.6 Nutrient gelatin (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Gelatin	120	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

3.1.4.7 Nutrient starch agar (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

3.1.4.8 TSI agar (Triple Sugar Iron Agar) (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	15	กรัม
Proteos-peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose (saccharose)	10	กรัม
Glucose (dextrose)	1	กรัม
FeSO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.3	กรัม
Agar	12	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.4		

### 3.2 การคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

3.2.1 เก็บตัวอย่างดินหรือน้ำเสียจากบริเวณที่มีส่วนประกอบของไขมันจากแหล่งต่างๆ ที่มีการทับถมของไขมันเป็นเวลานาน โดยเก็บตัวอย่างจากทุกจุดให้กระจายทั่วทั้งบริเวณ

3.2.2 นำตัวอย่างดินและน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ มาใส่ในอาหารเหลวสูตร Mineral Salt medium, Rich medium และ M9 medium แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการเขย่าทุกวันและสังเกตดูลักษณะความขุ่นของอาหาร

3.2.3 ปิเปตตัวอย่างที่บ่มเป็นเวลา 2 วัน ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และทำการ spread plate ลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ก่อนนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตจนกระทั่งเห็นโคโลนีเกิดขึ้น

3.2.4 คัดเลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสแล้วนำมา cross streak ต่ลงบนอาหารแข็งสูตร Mineral Salt medium, Rich medium และ M9 medium เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.2.5 เมื่อได้เชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำมา simple streak ลงบนอาหารแข็งเพื่อเก็บรักษาเชื้อสำหรับการนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

### 3.3 การตรวจสอบการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวแต่ละสูตรคือ Mineral Salt medium, Rich-medium, M9 medium และ Mineral trace element ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำการเพาะเลี้ยงที่ 2 สภาวะคือ สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Arasu และคณะ, 2011) เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก ส่วนใสที่ได้นำไปกรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน และนำส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วไปทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรด 3-hydroxypropionic สาร 1,3-propanediol และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

### 3.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้นของกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol ในอาหารเหลวถูกตรวจสอบโดยเครื่อง HPLC รุ่น LG-20A ของบริษัท Shimadzu โดยใช้คอลัมน์ BP-0A จากบริษัท Benson polymeric ที่มีความยาว 300x7.5 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือ สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน Colum oven ทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับกรด 3-hydroxypropionic, กรด Malic, กรด Succinic, กรด Fumalic และ กรด Adipic วัดค่าโดย Detector คือ UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ในขณะที่กลีเซอรอลและสาร 1,3-propanediol วัดปริมาณโดยใช้ Detector คือ Refractive Index (RI) และปริมาณตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

### 3.5 การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

3.5.1 การศึกษาการสร้าง exoenzymes (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

ก. กระบวนการย่อยแป้ง (starch hydrolysis) หรือการสร้างอะไมเลส (amylase)

1. นำจานอาหารวุ้นที่เติมแป้งมาแบ่งเป็น 4 ส่วน
2. เชื้อเชื้อต่างๆ ที่ต้องการทดสอบมาใส่ในจานอาหารที่แบ่งออกเป็น 4 ส่วน โดย 1 ส่วน ใช้เป็นช่อง control อีก 3 ส่วนสำหรับลงเชื้อ
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน
4. ทำการตรวจผลการทดลอง โดยรดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมผิวหน้าวุ้น ไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับแป้งเกิดเป็นสีน้ำเงินเข้ม จุลินทรีย์สร้างอะไมเลสจะทำให้บริเวณใสรอบๆ โคลนนี้ บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

+ = เกิดกระบวนการย่อยแป้ง ไม่มีสีน้ำเงินรอบๆ เชื้อจุลินทรีย์  
- = ไม่เกิดกระบวนการย่อยแป้ง มีสีน้ำเงินเกิดขึ้น

ข. กระบวนการย่อยคาซีอิน (casein hydrolysis) หรือการสร้างคาซีอินเนส (caseinase)

1. นำหลอดอาหาร NA ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส มาเติมนมสดขาดมันเนยที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน
2. เทอาหาร NA ที่มีนมผสมอยู่ลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง
3. นำอาหารวุ้นที่เติมนมมาแบ่งเป็น 4 ส่วน โดย 1 ส่วนใช้เป็นช่อง control อีก 3 ส่วนสำหรับลงเชื้อ
4. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน
5. ตรวจผลการทดลอง โดยสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลนนี้ในกรณีที่เกิดการย่อยสลายคาซีอิน บันทึกผลการทดลองดังนี้

+ = เกิดบริเวณใสรอบๆ โคลนนี้ เกิดกระบวนการย่อยคาซีอิน  
- = ไม่เกิดบริเวณใส ไม่เกิดกระบวนการย่อยคาซีอิน

ค. กระบวนการย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) หรือการสร้างเจลาติเนส (gelatinase)

1. ใช้ลูป (loop) เชื้อเชื้อ แทะลงไปหลอดอาหารให้ถึงก้นหลอด แล้วดึงออกมาตรงๆ วิธีถ่ายเชื่อนี้เรียกว่า stab inoculation
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 วัน
3. ตรวจผลการทดลองโดยนำหลอดอาหารที่มีเชื้อมาแช่ในตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจดูว่าหลอดเชื้อใดที่อาหารไม่แข็งตัวแสดงว่าสามารถย่อยเจลาตินได้ โดยเทียบกับหลอด control แล้วบันทึกผลการทดลอง ดังนี้

+ = เกิดการย่อยเจลาติน  
- = ไม่เกิดการย่อยเจลาติน

ง. กระบวนการย่อยน้ำมัน (corn oil hydrolysis) หรือการสร้างไลเปส (lipase)

1. นำอาหารวุ้นเติมน้ำมันพืชมาแบ่งเป็น 4 ส่วน โดย 1 ส่วนใช้เป็นช่อง control อีก 3 ส่วนสำหรับลงเชื้อ

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

3. ตรวจสอบผลการทดลองโดยสังเกตการเกิดสีน้ำเงินของแอสซิดซอลต์ (acid salt) ของกรดไขมันรอบๆ โคลนินของเชื้อที่สามารถสร้างไลเปสได้

3.5.2 การทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

ก. การหมักน้ำตาล (sugar fermentation)

1. ใส่เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆลงในหลอดอาหารแต่ละชนิด โดยมีหลอดอาหารเป็นหลอด control (ไม่ใส่เชื้อ) อย่าเขย่าหลอดอาหารเพื่อป้องกันการเกิดฟองแก๊สในหลอดดักแก๊ส

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

3. ตรวจสอบผลการทดลองในแต่ละหลอดโดยสังเกตการเกิดกรดซึ่ง indicator จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส (Durham tube) บันทึกผลการทดลอง

A = เกิดกรด

AG = เกิดกรดและแก๊ส

NC = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

B = เกิดต่าง (สีน้ำเงิน)

ข. การเปลี่ยนแปลงใน TSI (Triple sugar iron agar)

1. ใส่เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆลงในหลอดอาหารโดยวิธี stab inoculation

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

3. ตรวจสอบผลการทดลองโดยตรวจ

- การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ สังเกตจากตะกอนสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ (FeS) ที่เกิดขึ้นที่ก้นหลอดหรือบริเวณรอยลากเชื้อ

- การเกิดกรด โดยสีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

- การเกิดแก๊ส สังเกตจากการแยกหรือรอยแตกของอาหาร

บันทึกผลการทดลอง ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงการบันทึกผลการทดลองของการเปลี่ยนแปลงใน TSI (Triple sugar iron agar)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะอาหาร	ปฏิกิริยา
ตะกอนสีดำ	เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H <sub>2</sub> S)
อาหารที่มีผิวหน้าไม่เปลี่ยนสีและอาหารที่ก้นหลอดสีเหลือง	เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส
อาหารที่มีผิวหน้าและก้นหลอด มีสีเหลือง	เกิดการหมักน้ำตาลแลคโทสและ/น้ำตาลซูโคส
อาหารที่มีรอยแตกหรือฟองอากาศ	เกิดแก๊ส
อาหารไม่เปลี่ยนสี	ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวโดยมีการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 5 สูตร คือ Minimal medium, Rich medium, Mineral medium, Bioreactor medium และ Mineral trace element (Drozdzyńska และคณะ, 2014) เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเพื่อนำมาตรวจสอบปริมาณกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ที่ผลิตขึ้นโดยเครื่อง HPLC ต่อไป

### 3.7 การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารแข็งโดยดูสี รูปร่าง ความหนืด ขอบ และลักษณะเนื้อสัมผัสของโคโลนี จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและวัดขนาดของเซลล์จุลินทรีย์



## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด

ตัวอย่างแหล่งดินที่นำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ได้จากแหล่งดินและน้ำเสียบริเวณร้านอาหาร และบริเวณอาคารบ้านเรือนต่างๆ ซึ่งมีไขมันสะสมอยู่ โดยไขมันนั้นจะมีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบ เมื่อมีการชะล้างสิ่งสกปรกจากกิจกรรมต่างๆ ทำให้เกิดการทับถมในบริเวณดังกล่าวเป็นเวลานาน จึงมีการสะสมของจุลินทรีย์และอาจพบผลพลอยได้ที่เกิดจากหมักกลีเซอรอลของจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดต่างๆ โดยเฉพาะการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ดังนั้นจึงได้เลือกเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินและน้ำเสียเหล่านี้เพื่อนำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol โดยลักษณะตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาทำคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์แสดงดังรูป 4.1



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำตัวอย่างดินและน้ำเสียจากทั้งหมด 3 แห่ง 23 บริเวณ มาทำการตัดแยกจุลินทรีย์ โดยวิธี Spreadplate technique ลงบนอาหารแข็ง Mineral Salt medium, Rich medium และ M9 medium ที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Arasu และคณะ, 2011) เป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อใช้ตรวจสอบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด (เกิดโซนใส) (Takeshi และคณะ, 1981) โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ถูกนำมาคัดแยกจาก 23 ตัวอย่างจำนวน 138 ไอโซเลทที่สามารถสร้างโซนใสได้ โดยไอโซเลทที่คัดแยกได้จากสูตรอาหาร Mineral Salt medium มีจำนวน 13 ไอโซเลท สูตรอาหาร Rich medium มี 46 ไอโซเลท และสูตรอาหาร M9 medium มีจำนวน 79 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างที่สามารถตัดแยกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนใสและลักษณะโคโลนี

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
จังหวัดกระบี่ 1	2.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.1.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.1.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.1.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 2	2.2	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.2.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.2.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.2.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 3	2.3	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.3.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.3	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.3	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 4	2.4	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.4.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.4	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.4.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างที่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนใสและลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
จังหวัดกระบี่ 4(ต่อ)	4.4	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.4.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 5	2.5	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.5.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.5	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.5.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.5	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.5.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 6	2.6	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.6.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.6	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.6.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.6	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.6.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 7	2.7	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.7.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.7	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.7.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.7	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.7.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 8	2.8	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.8.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.8	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.8.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.8	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.8.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 9	2.9	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.9.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.9	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.9.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.9	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.9.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
จังหวัดกระบี่ 10	2.10	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.10.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างที่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนไฮและลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
จังหวัดกระบี่ 10(ต่อ)	3.10	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.10.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.10	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.10.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
กล้วยทอด 1 (เศษอาหารร้านกล้วยทอด)	2.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.1.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.1.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.1.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
กล้วยทอด 2 (เศษผลไม้ร้านกล้วยทอด)	1.2	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	1.2.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.2	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.2.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.2.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.2.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
กล้วยทอด 3 (ใต้กระทะกล้วยทอด)	2.3	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.3.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.3	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
กล้วยทอด 4 (บริเวณล้างจานโรงเก่า)	2.8	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.8.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างที่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนไลและลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
เก๊ก 1 (คลองน้ำริมรางรถไฟ)	1.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	1.1.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.1.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.1.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.1.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
เก๊ก 2 (บริเวณล้างจาน ร้านอาหารริมราง)	1.2	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	1.2.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.2	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.2.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.2.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.2.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
เก๊ก 3 (บริเวณถังขยะเก๊กงาม)	2.3	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.3.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.3	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.3	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.3.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
เก๊ก 4 (ร้านไถ่ย่างทางเชื่อม)	2.4	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.4.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
เก๊ก 5 (ร้านอาหารพี่เอเก๊ก 1)	1.5.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.5	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.5.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.5	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.5.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.5	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.5.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
เก๊ก 6 (ร้านอาหารตรงข้ามวัดปลูก ศรัทธา)	1.6	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	1.6.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.6	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างที่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกิดโซนไฮและลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
เก๊ก 6(ต่อ)	2.6.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
เก๊ก 7 (บริเวณถังขยะตลาด สุวรรณภูมิ)	2.7	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.7.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.7	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.7.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.7	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.7.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
เก๊ก 8 (บริเวณล้างจาน จ.ขอนแก่น)	1.9	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	1.9.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.9	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.9.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.9	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.9.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.9	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.9.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
เก๊ก 9 (ดินน้ำค้ำจาก จ.ขอนแก่น)	1.10	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	1.10.1	สีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ
	2.10	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	2.10.1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว
	3.10	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	3.10.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.10	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว
	4.10.1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มีเมือกเหนียว

เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์และตรวจสอบลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างโซนไฮได้ทั้งหมด 138 ไอโซเลท จากตารางที่ 4.1 จึงนำไปทำการตรวจสอบการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากอาหารแข็ง Mineral Salt medium และ Rich medium ไปเลี้ยงในอาหารเหลว Mineral Salt medium และ Rich medium ส่วนอาหารแข็ง M9 medium จะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว M9 medium และ Mineral trace element สำหรับตรวจสอบการผลิตกรด โดยทำการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะคือสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที (Arasu และคณะ, 2011) เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก ส่วนใสที่ได้นำไปกรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน และนำส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วไปทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรด 3-hydroxypropionic สาร 1,3-propanediol และ สารเมตาบอไลต์ต่างๆ โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic (3-HP) หรือสาร 1,3-propanediol (1,3-PDO) จากจุลินทรีย์ที่สร้างโซลไธ

ไอโซเลท	สูตรอาหาร	กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		กรด 3-HP (กรัมต่อลิตร)		สาร 1,3-PDO (กรัมต่อลิตร)		กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)		กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)		กรดอะดีพิค (กรัมต่อลิตร)	
		นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า
รหัสเก่า													
รหัสใหม่													
2.1 CA1	Rich medium	28.273	22.647	4.560	4.204	0.000	0.000	1.062	0.981	1.438	1.139	2.337	1.416
2.2 CA2	Rich medium	29.733	27.718	4.692	3.965	0.000	0.000	1.070	0.878	1.468	0.978	2.517	1.328
2.3 CA3	Rich medium	30.966	27.986	2.375	5.773	0.000	0.000	0.063	0.983	0.487	0.000	1.413	1.417
2.4 CA4	Rich medium	29.278	18.965	2.416	4.695	0.000	0.000	0.058	1.018	0.498	1.450	1.496	2.396
2.5 CA5	Rich medium	28.872	18.120	4.268	4.875	0.000	0.000	0.942	1.094	1.292	1.448	2.287	2.445
2.6 CA6	Rich medium	32.238	30.577	2.503	1.323	0.000	0.000	0.000	0.535	1.317	1.157	1.697	0.870
2.7 CA7	Rich medium	32.748	28.706	2.753	2.930	0.000	0.000	0.941	0.875	1.109	1.095	1.528	1.501
2.8 CA8	Rich medium	27.907	32.544	2.674	1.819	0.000	0.000	0.761	0.829	1.108	1.537	1.485	1.418
2.9 CA9	Rich medium	15.800	32.059	2.715	1.752	6.127	0.000	0.051	0.723	0.499	1.221	0.843	1.373
2.10 CA10	Rich medium	36.348	25.907	1.012	5.004	0.000	0.000	0.258	0.766	0.416	1.156	1.011	2.093
2.1 CB1	Rich medium	ND	ND	2.158	0.503	0.000	0.000	0.614	0.503	1.926	1.835	1.023	1.719
2.2 CB2	Rich medium	ND	ND	0.763	0.730	0.000	0.000	0.053	0.730	0.348	1.238	0.862	1.689
2.3 CB3	Rich medium	ND	ND	1.786	0.186	0.000	0.000	0.147	0.186	0.468	0.511	0.776	1.336
2.8 CB8	Rich medium	ND	ND	2.393	0.875	0.000	0.000	0.739	0.875	0.875	1.137	2.082	2.393

ตารางที่ 4.2 ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic (3-HP) หรือสาร 1,3-propanediol (1,3-PDO) จากจุลินทรีย์ที่สร้างโซลไธ (ต่อ)

ไอโซเลท	สูตรอาหาร	กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		กรด 3-HP (กรัมต่อลิตร)		สาร 1,3-PDO (กรัมต่อลิตร)		กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)		กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)		กรดอะดีพิค (กรัมต่อลิตร)		
		นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	
รหัส เก่า														
รหัส ใหม่														
2.1	CA1	Rich medium	28.273	22.647	4.560	4.204	0.000	0.000	1.062	0.981	1.438	1.139	2.337	1.416
2.2	CA2	Rich medium	29.733	27.718	4.692	3.965	0.000	0.000	1.070	0.878	1.468	0.978	2.517	1.328
2.3	CA3	Rich medium	30.966	27.986	2.375	5.773	0.000	0.000	0.063	0.983	0.487	0.000	1.413	1.417
2.4	CA4	Rich medium	29.278	18.965	2.416	4.695	0.000	0.000	0.058	1.018	0.498	1.450	1.496	2.396
2.5	CA5	Rich medium	28.872	18.120	4.268	4.875	0.000	0.000	0.942	1.094	1.292	1.448	2.287	2.445
2.6	CA6	Rich medium	32.238	30.577	2.503	1.323	0.000	0.000	0.000	0.535	1.317	1.157	1.697	0.870
2.7	CA7	Rich medium	32.748	28.706	2.753	2.930	0.000	0.000	0.941	0.875	1.109	1.095	1.528	1.501
2.8	CA8	Rich medium	27.907	32.544	2.674	1.819	0.000	0.000	0.761	0.829	1.108	1.537	1.485	1.418
2.9	CA9	Rich medium	15.800	32.059	2.715	1.752	6.127	0.000	0.051	0.723	0.499	1.221	0.843	1.373
2.10	CA10	Rich medium	36.348	25.907	1.012	5.004	0.000	0.000	0.258	0.766	0.416	1.156	1.011	2.093
2.1	CB1	Rich medium	ND	ND	2.158	0.503	0.000	0.000	0.614	0.503	1.926	1.835	1.023	1.719
2.2	CB2	Rich medium	ND	ND	0.763	0.730	0.000	0.000	0.053	0.730	0.348	1.238	0.862	1.689
2.3	CB3	Rich medium	ND	ND	1.786	0.186	0.000	0.000	0.147	0.186	0.468	0.511	0.776	1.336
2.8	CB8	Rich medium	ND	ND	2.393	0.875	0.000	0.000	0.739	0.875	0.875	1.137	2.082	2.393

ตารางที่ 4.2 ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic (3-HP) หรือสาร 1,3-propanediol(1,3-PDO) จากแบคทีเรียที่สร้างไขมันใส (ต่อ)

ไอโซเลท	สูตรอาหาร		กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		กรด 3-HP (กรัมต่อลิตร)		สาร 1,3-PDO (กรัมต่อลิตร)		กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)		กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)		กรดอะดีพิค (กรัมต่อลิตร)	
			นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า
รหัสเก่า														
รหัสใหม่														
2.1	CC1	Rich medium	26.926	18.893	ND	ND	0.000	0.000	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2.2	CC2	Rich medium	29.772	8.671	ND	6.287	0.000	0.000	0.611	ND	1.432	ND	1.940	1.090
2.3	CC3	Rich medium	29.967	28.334	ND	2.130	0.000	0.000	0.852	ND	0.905	ND	1.052	1.787
2.4	CC4	Rich medium	11.599	2.386	ND	2.116	8.628	9.148	0.000	ND	0.613	ND	1.052	1.981
2.5	CC5	Rich medium	29.726	26.415	ND	3.178	0.000	0.000	0.562	ND	1.089	ND	1.787	2.104
2.6	CC6	Rich medium	29.346	25.890	ND	1.705	0.000	0.000	0.136	ND	0.265	ND	1.981	2.104
2.7	CC7	Rich medium	22.501	7.921	ND	5.567	0.000	0.000	0.657	ND	1.534	ND	2.104	1.792
2.9	CC9	Rich medium	13.782	5.676	ND	5.281	7.556	7.166	0.590	ND	1.400	ND	1.792	1.573
2.10	CC10	Rich medium	29.518	25.804	ND	2.730	0.000	1.931	0.603	ND	0.953	ND	1.573	0.000
1.2	BB2	Mineral Salt medium	ND	ND	0.113	0.115	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1.1	BC1	Mineral Salt medium	27.777	25.933	ND	0.411	0.000	0.000	0.000	ND	0.000	ND	0.000	0.000
1.2	BC2	Mineral Salt medium	27.558	25.033	ND	0.149	0.000	0.000	0.000	ND	0.067	ND	0.000	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ 3-hydroxypropionic(3-HP) หรือสาร 1,3-propanedio(1,3-PDO) จากแบคทีเรียที่สร้างโซลโนไล (ต่อ)

ไอโซเลท	สูตรอาหาร	กิติเซอร์อลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		กรด 3-HP (กรัมต่อลิตร)		สาร 1,3-PDO (กรัมต่อลิตร)		กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)		กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)		กรดอะดีพิค (กรัมต่อลิตร)	
		นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า
รหัส เก่า													
รหัส ใหม่													
1.6	Mineral Salt medium	26.948	25.528	ND	0.222	1.515	0.000	ND	0.000	ND	0.064	ND	0.170
1.9	Mineral Salt medium	28.019	25.269	ND	0.112	1.506	0.000	ND	0.000	ND	0.000	ND	0.308
1.10	Mineral Salt medium	27.292	25.597	ND	0.109	1.407	0.000	ND	0.000	ND	0.000	ND	0.000
3.1	M9 medium	24.650	20.982	0.531	0.120	1.615	1.715	0.022	0.019	0.072	0.057	0.000	0.244
3.2	M9 medium	27.559	24.175	0.560	0.124	1.514	1.460	0.000	0.021	0.058	0.000	0.000	0.234
3.3	M9 medium	27.569	21.933	0.523	0.140	1.579	1.524	0.000	0.047	0.081	0.075	0.000	0.466
3.5	M9 medium	20.189	17.011	ND	0.189	3.666	4.603	ND	0.000	ND	0.057	ND	0.353
3.7	M9 medium	28.736	26.234	ND	0.112	0.000	1.581	ND	0.026	ND	0.000	ND	0.164
3.9	M9 medium	28.471	26.562	ND	0.125	1.443	1.399	ND	0.023	ND	0.000	ND	0.000
3.10	M9 medium	27.570	27.125	ND	0.127	1.437	0.000	ND	0.021	ND	0.000	ND	0.000
4.1	Mineral trace element	19.595	25.103	1.263	1.330	4.160	4.863	0.144	0.108	0.309	0.459	0.069	0.247
4.2	Mineral trace element	26.282	32.537	1.122	0.460	2.377	4.466	0.023	0.120	0.112	0.193	0.115	0.347

ตารางที่ 4.2 ผลการผลิตรก 3-hydroxypropionic (3-HP) หรือสาร 1,3-propanedio(1,3-PDO) จากแบคทีเรียที่สร้างไซนไส(ต่อ)

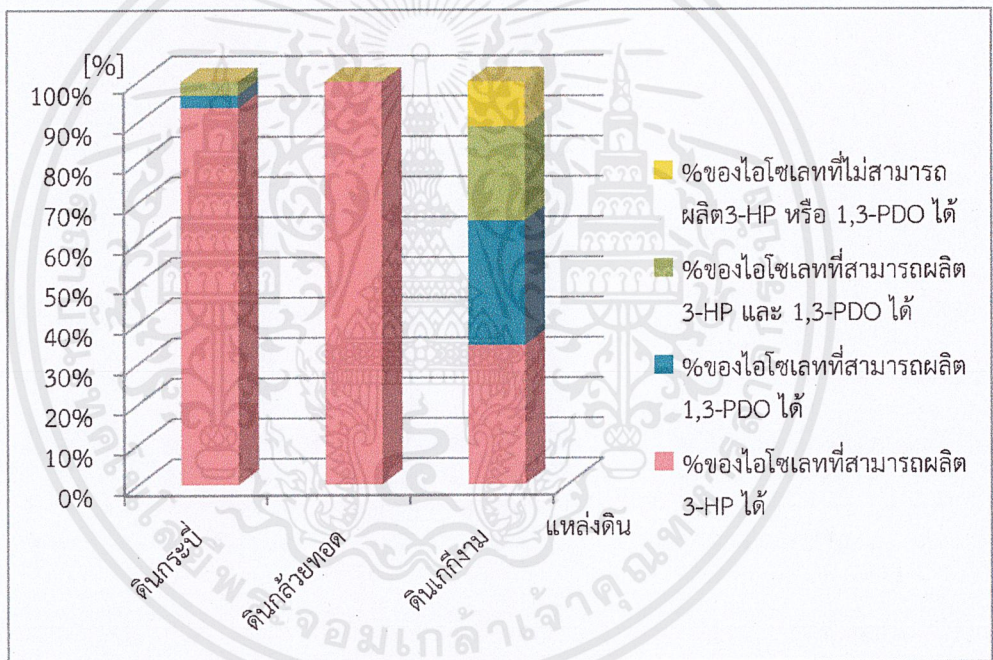
ไอโซเลท	สูตรอาหาร		กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		กรด 3-HP (กรัมต่อลิตร)		สาร 1,3-PDO (กรัมต่อลิตร)		กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)		กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)		กรดอะดีพิค (กรัมต่อลิตร)	
	รหัส เก่า	รหัส ใหม่	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า	นึ่ง	เขย่า
4.3	KC3	Mineral trace element	25.184	26.709	1.122	1.428	2.441	4.476	0.000	0.096	0.097	0.223	0.131	0.210
4.5	KC5	Mineral trace element	9.546	5.228	0.283	0.313	7.968	13.09	0.065	0.031	0.259	0.388	0.119	0.427
4.7	KC7	Mineral trace element	25.728	40.493	0.160	0.167	2.189	0.000	0.058	0.026	0.163	0.102	0.123	0.117
4.9	KC9	Mineral trace element	28.946	42.754	0.324	0.155	2.063	2.361	0.017	0.000	0.246	0.000	0.000	0.000
4.10	KC10	Mineral trace element	27.261	43.259	1.446	0.524	2.433	2.520	0.000	0.000	0.095	0.000	0.093	0.069

**\*หมายเหตุ**

- BA, CA และ KA คือ ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินจากกระบี่
- BB, CB และ KB คือ ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินกล้วยทอด
- BC, CC และ KC คือ ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินเเกกักริมราง
- ND คือ ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ กลีเซอรอล 30 กรัมต่อลิตรจำนวนรอบเขย่า 150 รอบตอนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากตารางที่ 4.2 แสดงผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol จากจุลินทรีย์ที่สร้างโซนในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการผลิตกรดด้วยเครื่อง HPLC จากการตรวจสอบพบว่า จุลินทรีย์จากแหล่งดินทั้งหมด 23 บริเวณ คัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 138 ไอโซเลท มีจุลินทรีย์ทั้งหมด 57 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้ แต่พบว่ามีจุลินทรีย์ 11 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้มากกว่า 4 กรัมต่อลิตร และมีจุลินทรีย์ 11 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้มากกว่า 6 กรัมต่อลิตร แหล่งดินจากเก็กริมราง สามารถพบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้มากที่สุด สามารถแสดงร้อยละของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic และสาร 1,3-propanediol ของแต่ละตัวอย่างดินดังรูปที่ 4.2 อย่างไรก็ตามเมื่อคัดแยกจุลินทรีย์โดยใช้อาหาร Mineral salt medium พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือ สาร 1,3-propanediol ได้น้อยมาก

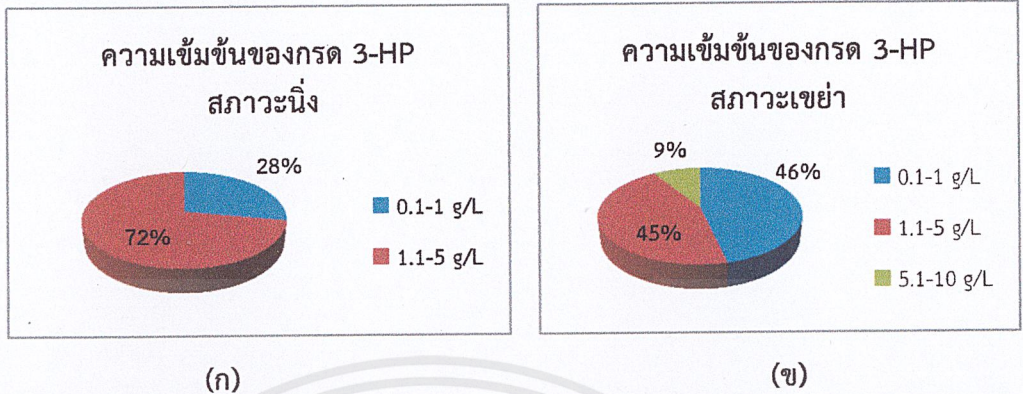


รูปที่ 4.2 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ของแต่ละตัวอย่างดิน

จากรูปที่ 4.2 แสดงร้อยละของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ของแต่ละตัวอย่างดิน เมื่อแยกตามดินแต่ละแหล่งจะพบว่า ดินกระบี่และดินกล้วยทอดมีผลการทดลองของไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้มากที่สุด ส่วนดินเก็กริมราง มีผลการทดลองของไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้น้อยกว่าดินกระบี่และดินกล้วยทอด แต่มีผลการทดลองของไอโซเลทที่สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้มากที่สุด จึงได้นำร้อยละการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ของแต่ละตัวอย่างดินมาทำการหาร้อยละของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่มีความสามารถใน

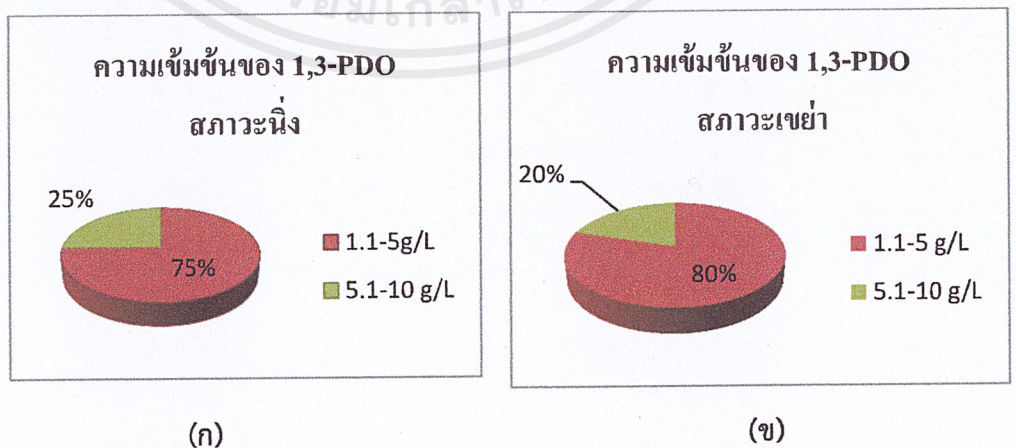
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรด 3- hydroxypropionic (รูปที่ 4.3) และสาร 1,3-propanediol (รูปที่ 4.4) ทั้งสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.3 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic ที่ความเข้มข้นในช่วงต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง (ก) และสภาวะเขย่า (ข)

จากรูปที่ 4.3 แสดงร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic ที่ความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ในสภาวะนิ่งพบว่าจุลินทรีย์ร้อยละ 72% มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ในช่วงความเข้มข้น 1.1-5 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือจุลินทรีย์ร้อยละ 28% มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ในช่วงความเข้มข้น 0.1-1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่าพบว่าจุลินทรีย์ร้อยละ 46% มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ในช่วงความเข้มข้น 0.1-1 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือจุลินทรีย์ร้อยละ 45% มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ในช่วงความเข้มข้น 1.1-5 กรัมต่อลิตรและจุลินทรีย์ร้อยละ 9% มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ในช่วงความเข้มข้น 5.1-10 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์ที่ผลิตได้สูงที่สุดคือไอโซเลท CC2 สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 6.287 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินกระบี่และการหาร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตสาร 1,3-propanediol แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตสาร 1,3-propanediol ที่ความเข้มข้นในช่วงต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง (ก) และสภาวะเขย่า (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.4 แสดงร้อยละของจุลินทรีย์ที่ผลิตสาร 1,3-propanediol ในสภาวะนิ่งพบว่า จุลินทรีย์ร้อยละ 75% มีความสามารถในการผลิตสาร 1,3-propanediol ในช่วงความเข้มข้น 1.1-5 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือจุลินทรีย์ร้อยละ 25% มีความสามารถในการผลิตสาร 1,3-propanediol ในช่วงความเข้มข้น 0.1–1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่าพบว่าจุลินทรีย์ร้อยละ 80% มีความสามารถในการผลิตสาร 1,3-propanediol ในช่วงความเข้มข้น 1.1–5 กรัมต่อลิตรและจุลินทรีย์ร้อยละ 20% มีความสามารถในการผลิตสาร 1,3-propanediol ในช่วงความเข้มข้น 5.1-10 กรัมต่อลิตร และ 10.1-15 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์ที่ผลิตได้สูงที่สุดคือไอโซเลท KC5 สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 13.09 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินเกี๋ยมาราง จากนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้ความเข้มข้นของกรดที่สูงที่สุดจากการทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาต่อ

#### 4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol เพื่อนำไปศึกษาต่อ

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol เพื่อทำการศึกษาต่อ ซึ่งได้คัดเลือกจุลินทรีย์มา 15 ไอโซเลท โดยคัดเลือกจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 4 กรัมต่อลิตรขึ้นไป หรือสามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 6 กรัมต่อลิตรขึ้นไป ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ที่คัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อ

ไอโซเลท	อาหาร/สภาวะในการเพาะเลี้ยง	กลีเซอรอลที่ใช้ไป (กรัม/ลิตร)	กรด 3-HP (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของกรด 3-HP (โมล/โมล)	สาร 1,3-PDO (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของสาร 1,3-PDO (โมล/โมล)
CA1	Rich medium/สภาวะนิ่ง	1.727	4.560	0.050	0.000	0.000
CA1	Rich medium/สภาวะเขย่า	7.353	4.204	0.046	0.000	0.000
CA2	Rich medium/สภาวะนิ่ง	0.267	4.692	0.052	0.000	0.000
CA3	Rich medium/สภาวะเขย่า	2.014	5.773	0.064	0.000	0.000
CA4	Rich medium/สภาวะเขย่า	11.035	4.695	0.052	0.000	0.000
CA5	Rich medium/สภาวะนิ่ง	1.121	4.268	0.047	0.000	0.000
CA5	Rich medium/สภาวะเขย่า	11.88	4.875	0.054	0.000	0.000
CA9	Rich medium/สภาวะนิ่ง	14.200	2.715	0.030	6.127	0.068
CA10	Rich medium/สภาวะเขย่า	4.093	5.004	0.055	0.000	0.000
CC2	Rich medium/สภาวะเขย่า	21.329	6.287	0.069	0.000	0.000
CC4	Rich medium/สภาวะนิ่ง	18.401	ND	0.000	8.628	0.095
CC7	Rich medium/สภาวะเขย่า	22.079	5.567	0.061	0.000	0.000
CC9	Rich medium/สภาวะนิ่ง	16.218	ND	0.000	7.556	0.083

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

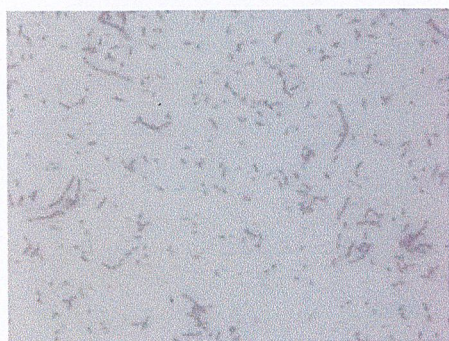
CC9	Rich medium/สภาวะเขย่า	24.324	5.281	0.058	7.166	0.079
KC1	M9 medium / สภาวะนิ่ง	10.405	1.263	0.014	4.160	0.046
KC1	M9 medium / สภาวะเขย่า	4.897	1.330	0.014	4.863	0.053
KC2	M9 medium / สภาวะเขย่า	0.463	0.460	0.005	4.466	0.049
KC3	M9 medium / สภาวะเขย่า	3.291	1.428	0.015	4.476	0.049
KC5	Mineral Salt medium / สภาวะเขย่า	24.772	0.313	0.003	13.092	0.145
KC5	M9 medium / สภาวะนิ่ง	20.454	0.283	0.003	7.968	0.088
KC5	M9 medium / สภาวะเขย่า	12.989	0.189	0.002	4.603	0.051

\*หมายเหตุ รหัส CA คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินกระบี่  
 รหัส CC คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินร้านอาหารตามสั่งริมราง  
 รหัส KC คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินเกี๋ยริมราง  
 ND คือ ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

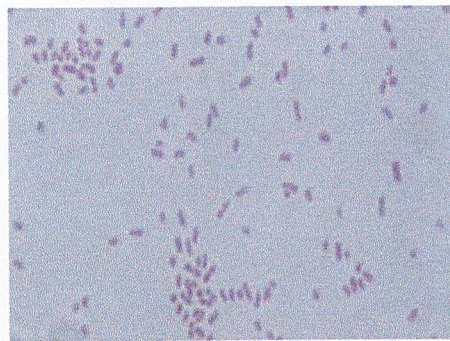
จากตารางที่ 4.3 ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้ความเข้มข้นสูง จำนวน 15 ไอโซเลท จากสูตรอาหารสำหรับตรวจสอบการผลิตกรดของเชื้อ *Citrobacter* sp. และ *Klebsiella* sp. เนื่องจากในปี 2008 Raj และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ทางชีวภาพพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้โดยใช้น้ำตาลกลูโคสหรือกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันจุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Lactobacillus collinoides*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* และ ในปี 2009 Saxena และคณะ ได้พบเกี่ยวกับวิถีเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ที่มีความสามารถหมักน้ำตาลเป็นกลีเซอรอล และสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น สาร 1,3-propanediol ได้มีการศึกษาจุลินทรีย์โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol จากกลีเซอรอลอยู่ในจีนัส *Klebsiella*, *Clostridia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Lactobacilli* ส่วนไอโซเลทที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารสำหรับตรวจสอบการผลิตกรดของเชื้อ *Bacillus* sp. พบว่าสามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้น้อย จากการศึกษาของ Travers และคณะ 1987 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. จะเน้นการผลิตโปรตีน เช่น *B. thuringiensis* ผลิตโปรตีนสารพิษฆ่าแมลง เป็นต้น จึงได้นำจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ซึ่งผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้สูงมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 4.5

#### 4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

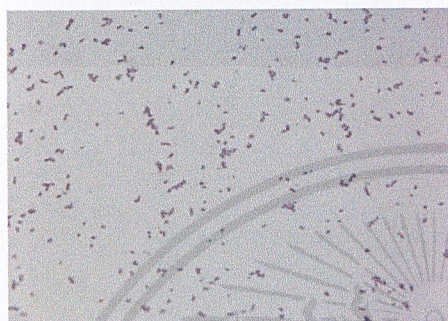
จากจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ที่ทำการคัดเลือกได้ จึงนำมาทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่างและการจัดเรียงตัว การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และขนาดของจุลินทรีย์ แสดงผลดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.4



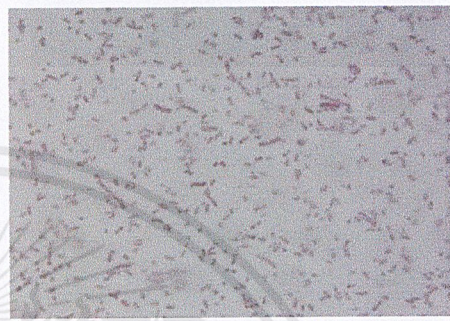
(ก)



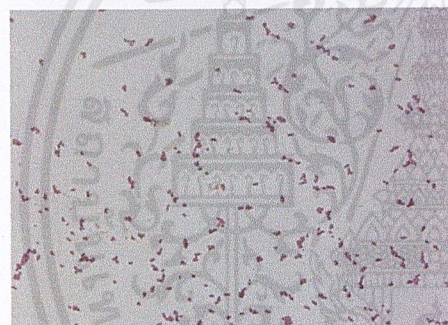
(ข)



(ค)



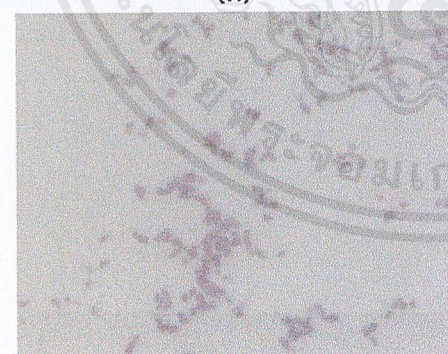
(ค)



(ค)



(ง)

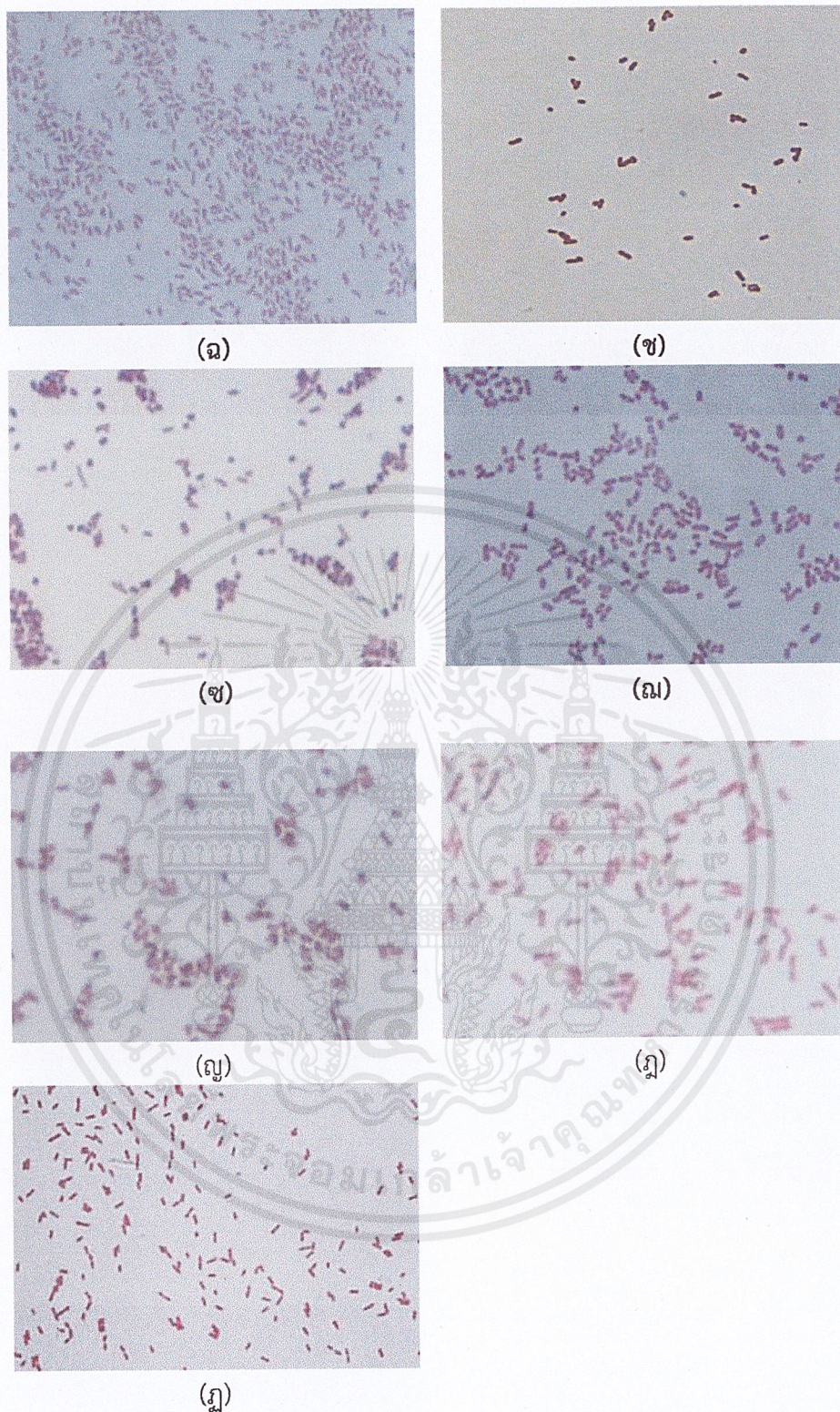


(ง)



(จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X  
 (ก)CA1, (ข)CA2, (ฅ)CA3, (ค)CA4, (ค)CA5, (ฌ)CA9, (ง)CA10, (จ)CC2, (ฉ)CC5, (ช)CC7, (ซ)CC9,  
 (ฅ)KC1, (ญ)KC2, (ฎ)KC3และ(ฎ)KC5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของโคลนนี้ รูปร่างและการจัดเรียงตัว การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และขนาดของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ไอโซ- เลข	ลักษณะโคลนนี้	รูปร่างและ การจัดเรียงตัว	การสร้าง สปอร์	การย้อม แกรม	ขนาดเซลล์ (ไมครอน)
CA1	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้น เรียงตัวต่อกัน เป็นสาย	ไม่มี	แกรมลบ	0.8
CA2	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.9
CA3	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.6
CA4	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้น เรียงตัวต่อกัน เป็นสาย	ไม่มี	แกรมลบ	1
CA5	สีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.8
CA9	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นเกาะกัน เป็นกลุ่ม	ไม่มี	แกรมลบ	1.1
CA10	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.9
CC2	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.9
CC5	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.7
CC7	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้น เรียงตัวจับกัน เป็นคู่	ไม่มี	แกรมลบ	1.2
CC9	สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	0.9
KC1	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มี เมือกเหนียว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์ เดี่ยวๆ	ไม่มี	แกรมลบ	1.0
KC2	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มี เมือกเหนียว	ท่อนสั้น เรียงตัวจับกัน เป็นคู่	ไม่มี	แกรมลบ	0.8
KC3	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มี เมือกเหนียว	ท่อนสั้น เรียงตัวจับกัน เป็นคู่	ไม่มี	แกรมลบ	0.9
KC5	สีขาวขุ่น กลม ใหญ่ ขอบเรียบ มี เมือกเหนียว	ท่อนสั้น เรียงตัวจับกัน เป็นคู่	ไม่มี	แกรมลบ	1.3

\*หมายเหตุ      รหัส CA      คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินกระป๋อง  
                          รหัส CC      คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินร้านอาหารตามสั่งริมราง  
                          รหัส KC      คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินเก็กริมราง

จากตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของโคโลนี รูปร่างและการจัดเรียงตัว การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และขนาดของจุลินทรีย์จำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 4 กรัมต่อลิตรขึ้นไป หรือสามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 6 กรัมต่อลิตรขึ้นไป จากการทดลอง ได้นำมาศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่าง การจัดเรียงตัว การย้อมสปอร์ ขนาดเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้พบว่าไอโซเลท CA และ CC สามารถจัดเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรก มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง และกลุ่มที่ 2 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น แต่ทั้งหมดติดสีแดงของ safanin จึงจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ มีขนาดเซลล์ตั้งแต่ 0.6-1.2 ไมครอน ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีส่วนที่คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Michael และคณะ 1994 ในการจำแนกทางชีวเคมีของ *Citrobacteria* ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกซึ่งพบว่า *Citrobacteria* ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน และเป็นพวกที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์เช่นเดียวกับไอโซเลท CA และ CC ส่วนไอโซเลท KC มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น มีเมือกเหนียว ทั้งหมดติดสีแดงของ safanin จึงจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ มีขนาดเซลล์ตั้งแต่ 0.8-1.3 ไมครอนและในปี 2011 Sikarwar และ Batra ได้ทำการศึกษากำหนดลักษณะของ *Klebsiella Pneumoniae* จากแคปซูล พบว่า ย้อมติดสีแกรมลบมี รูปร่างเป็นท่อน และเป็นพวกที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ พบว่าลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลักษณะของไอโซเลท KC เมื่อทราบลักษณะโคโลนี รูปร่าง การจัดเรียงตัว การย้อมสปอร์ ขนาดเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลทแล้ว จึงนำจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลทมาทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเพื่อทำการศึกษากำหนดการสร้าง exoenzymes, ทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ โดยการหมักน้ำตาล และการเปลี่ยนแปลงใน TSI

#### 4.4 การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ดังนี้

##### 4.4.1 การศึกษาการสร้าง exoenzymes

โดยกระบวนการย่อยแป้ง (starch hydrolysis) หรือการสร้างอะไมเลส (amylase) กระบวนการย่อยคาซีอิน (casein hydrolysis) หรือการสร้างคาซีอินเนส (caseinase) กระบวนการย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) หรือการสร้างเจลาติเนส (gelatinase) และกระบวนการย่อยน้ำมัน (cornoil hydrolysis) หรือการสร้างไลเปส (lipase) ให้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการสร้าง exoenzymes จากจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

แหล่งดิน	ไอโซเลท	การสร้าง อะไมเลส	การย่อย คาซีอิน	การย่อย เจลาติน	การย่อย น้ำมัน
ดินกระบี่	CA1	-	-	+	-
	CA2	-	-	-	-
	CA3	-	-	+	-
	CA4	-	-	-	-
	CA5	-	-	+	-

ตารางที่ 4.5 แสดงการสร้าง exoenzymes จากจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก (ต่อ)

แหล่งดิน	ไอโซเลท	การสร้างอะไมเลส	การย่อยคาซิอิน	การย่อยเจลาติน	การย่อยน้ำมัน
ดินกระป๋อง	CA9	-	+	-	-
	CA10	-	-	+	-
เกี๋ยมร้าง	CC2	-	+	+	-
	CC5	-	-	+	-
	CC7	-	-	+	-
	CC9	-	-	-	-
	KC1	-	-	+	-
	KC2	-	-	-	-
	KC3	-	-	+	-
KC5	-	+	+	-	

\*หมายเหตุ

- Amylase (-) คือ ไม่เกิดกระบวนการย่อยแป้ง มีสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้น  
 (+) คือ เกิดกระบวนการย่อยแป้ง ไม่มีสีน้ำเงินรอบๆแบคทีเรีย
- Caseinase (-) คือ ไม่เกิดบริเวณใส ไม่เกิดกระบวนการย่อยคาซิอิน  
 (+) คือ เกิดบริเวณใสรอบๆแบคทีเรีย เกิดกระบวนการย่อยคาซิอิน
- Gelatinase (-) คือ ไม่เกิดการย่อยเจลาติน  
 (+) คือ เกิดการย่อยเจลาติน
- Lipase (-) คือ ไม่สร้างไลเปส  
 (+) คือ สร้างไลเปส (เกิดสีน้ำเงินของแอซิดซอลล์ ของกรดไขมันรอบๆโคโลนี)

จากตารางที่ 4.5 จุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากการทดลองได้นำมาตรวจสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์โดยทำการศึกษากการสร้าง exoenzymes ต่างๆดังนี้

การทดสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของแบคทีเรียโดยกระบวนการย่อยแป้ง (starch hydrolysis) หรือการสร้างอะไมเลส (amylase) พบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ไม่เกิดกระบวนการย่อยแป้ง

การทดสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของแบคทีเรียโดยกระบวนการย่อยคาซิอิน (casein) หรือการสร้างคาซิเนส (caseinase) โดยการสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งจุลินทรีย์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือเกิดกระบวนการย่อยคาซิอินได้มีจำนวน 3 ไอโซเลทคือ CA9, CC2 และKC5 กลุ่มที่สองคือไม่เกิดกระบวนการย่อยคาซิอินมีจำนวน 12 ไอโซเลทคือ CA1, CA2, CA3, CA4, CA5, CA10, CC5, CC7, CC9, KC1, KC2 และKC3

การทดสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของแบคทีเรีย โดยวิธีการย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) สามารถแบ่งจุลินทรีย์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือเกิดการย่อยเจลาตินได้มีจำนวน 9 ไอโซเลท คือ CA1, CA3, CA5, CC2, CC5, CC7, KC1, KC3 และ KC5 กลุ่มที่สองคือไม่เกิดการย่อยเจลาติน มีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ CA2, CA4, CA10, CC9 และ KC2

การทดสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของแบคทีเรียโดยกระบวนการย่อยน้ำมัน (corn oil hydrolysis) หรือการสร้างไลเปส (lipase) พบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ไม่เกิดกระบวนการย่อยแป้ง

#### 4.4.2 การทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ

โดยการหมักน้ำตาล (sugar fermentation) และการเปลี่ยนแปลงใน TSI ได้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงการทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ จากจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

แหล่งดิน	ไอโซ- เลท	การหมักน้ำตาล กลูโคส	การหมักน้ำตาล แลคโตส	การหมักน้ำตาล ซูโครส	TSI
กระบี่	CA1	AG	AG	AG	AG, FeS
	CA2	AG	AG	AG	AG
	CA3	AG	AG	AG	AG
	CA4	AG	AG	AG	AG
	CA5	AG	AG	AG	AG
	CA9	AG	AG	AG	AG
	CA10	AG	AG	AG	AG
เกี๋ยมราง	CC2	AG	AG	AG	AG
	CC5	AG	AG	AG	AG
	CC7	AG	AG	AG	A
	CC9	AG	AG	AG	AG
	KC1	AG	AG	AG	AG, FeS
	KC2	AG	AG	AG	AG
	KC3	AG	AG	AG	AG
	KC5	AG	AG	AG	AG

\*หมายเหตุ A คือ เกิดกรด  
AG คือ เกิดกรดและแก๊ส  
B คือ เกิดต่าง (สีน้ำเงิน)  
FeS คือ เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์  
NC คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

จากตารางที่ 4.6 จุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้สูง จากการทดลองได้นำมาตรวจสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงทาง

ชีวเคมีของแบคทีเรีย โดยวิธีการหมักด้วยน้ำตาล (sugar fermentation) และการเปลี่ยนแปลงใน TSI (Triple sugar iron agar)

การตรวจสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงในการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดคือกลูโคส, แลคโตส และซูโครสพบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท มีการเกิดกรดและแก๊สทุกไอโซเลท

การเปลี่ยนแปลงใน TSI พบว่าการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้ง 15 ไอโซเลท จัดได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มแรก เกิดกรดและแก๊สมี 12 ไอโซเลทคือ CA2, CA3, CA4, CA5, CA9, CA10, CC2, CC5, CC9, KC2, KC3 และ KC5 กลุ่มที่ 2 เกิดกรด, แก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟด์ มี 2 ไอโซเลทคือ CA1 และ KC1 และกลุ่มสุดท้าย มีการเกิดกรดอย่างเดียวคือ CC7

จากการศึกษาของ Revised และ Emended (1970) เรื่องกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของความแตกต่างในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้ทำการศึกษาในเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ทั้งหมด 5 กลุ่มคือ *Escherichia* sp., *Edwardsiella* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. และ *Citrobacter* sp. พบว่าการศึกษากการสร้าง exoenzymes ส่วนมากไม่เกิดการย่อยเจลาติน ไม่มีการสร้างไลเปส การหมักน้ำตาลสามารถเกิดขึ้นได้ทั้ง 2 แบบ คือ สามารถเกิดการหมักน้ำตาลและไม่เกิดการหมักน้ำตาลขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ถ้าเกิดการหมักน้ำตาลจะมีการสร้างกรดและแก๊สได้ จากลักษณะข้างต้นพบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ทั้ง 15 ไอโซเลท มีผลการทดลองบางส่วนที่คล้ายคลึงกับลักษณะของเชื้อในกลุ่ม *Klebsiella* sp. และ *Citrobacter* sp. คือการสร้าง exoenzymes ไม่เกิดการย่อยเจลาตินไม่สร้างไลเปส ส่วนการหมักน้ำตาลสามารถเกิดการสร้างกรดและแก๊สจากการทดลองด้วยเวลาที่จำกัด จึงได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ 3 ไอโซเลท คือ CA5, CC2 และ CC7 เป็นไอโซเลทที่สามารถผลิตกรดได้สูงที่สุด จากจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท มาทำการศึกษาสุตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ดังตารางที่ 4.7

#### 4.5 การศึกษาสุตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol

ได้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol จากจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ไอโซเลท มาจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ CC2, CA5 และ CC7 จากการศึกษาพบว่าไอโซเลท CC2 จากเก๊ก 2 บริเวณล้างจานร้านอาหารริมรางและ CC7 จากเก๊ก 7 บริเวณถังขยะตลาดนัดสุวรรณภูมิมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น เป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ การศึกษากการสร้าง exoenzymes พบว่า CC2 และ CC7 ไม่มีการสร้างอะไมเลส ไม่เกิดการย่อยคาซิอิน ไม่เกิดการย่อยน้ำมัน แต่มีการย่อยเจลาติน การตรวจสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงในการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดคือกลูโคส, แลคโตส และซูโครส พบว่า CC2 และ CC7 มีการเกิดกรดและแก๊สการเปลี่ยนแปลงใน TSI พบว่า CC2 มีการเกิดกรดและแก๊ส CC7 มีการเกิดกรดอย่างเดียว ส่วนไอโซเลท CA5 จากเก๊ก 5 ร้านอาหารฟือเอเก๊ก 1 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลืองเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ การศึกษากการสร้าง exoenzymes พบว่า CA5 ไม่มีการสร้างอะไมเลส ไม่เกิดการย่อยคาซิอิน ไม่เกิดการย่อยน้ำมัน แต่มีการย่อยเจลาตินการตรวจสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงในการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดคือกลูโคส, แลคโตส และซูโครสและการเปลี่ยนแปลงใน TSI พบว่ามีการเกิดกรดและแก๊สทั้งหมดจึงนำทั้ง 3 ไอโซเลท ไปทดสอบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ CA5, CC2 และ CC7 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือ

สาร 1,3-propanediol โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 5 สูตร คือ Minimal medium, Rich medium, Mineral medium, Bioreactor medium และ Preculture medium ใช้กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน และเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจสอบปริมาณ กรด 3-hydroxy-propionic หรือสาร 1,3-propanediol ที่ผลิตขึ้นโดยเครื่อง HPLC และผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol

สูตรอาหาร	ไอโซเลท CC2				ไอโซเลท CA5				ไอโซเลท CC7					
	กลีเซอรอลที่ใช้ไป (กรัม/ลิตร)	กรด 3-HP (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของกรด 3-HP (ไมล/ไมล)	สาร 1,3-PDO (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของ 1,3-PDO (ไมล/ไมล)	กรด 3-HP (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของกรด 3-HP (ไมล/ไมล)	สาร 1,3-PDO (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของ 1,3-PDO (ไมล/ไมล)	กลีเซอรอลที่ใช้ไป (กรัม/ลิตร)	กรด 3-HP (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของกรด 3-HP (ไมล/ไมล)	สาร 1,3-PDO (กรัม/ลิตร)	ผลได้ของ 1,3-PDO (ไมล/ไมล)
Minimal medium	10.560	0.779	0.073	0.000	0.000	0.14	0.013	0.000	0.000	10.638	0.14	0.013	0.000	10.282
Rich medium	12.450	4.085	0.328	0.029	0.365	2.67	0.214	0.046	0.046	8.435	2.67	0.214	0.390	13.258
Mineral medium	10.149	3.858	0.380	0.000	0.000	4.04	0.451	0.050	0.050	8.962	4.04	0.451	0.000	9.174
Bioreactor medium	13.751	2.916	0.212	0.258	0.356	2.80	0.196	0.025	0.025	14.258	2.80	0.196	0.362	13.522
Mineral trace element	13.033	1.995	0.150	0.000	0.000	1.90	0.716	0.000	0.000	10.799	1.90	0.716	0.000	12.564

\*หมายเหตุ รหัสด CA5 คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินกระบี่

รหัสด CC2 และ CC7 คือ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินเกี๋ยมาราง

จากตารางที่ 4.7 พบว่าไอโซเลท CC2 และ CC7 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Rich medium จะมีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้ดีที่สุด และมีการผลิตสาร 1,3-propanediol ร่วมด้วยเล็กน้อย ในขณะที่ไอโซเลท CA5 พบว่าสามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Mineral medium



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด จากแหล่งดินและแหล่งน้ำเสีย ทั้งหมด 3 แห่ง 23 บริเวณ ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกทั้งหมด 138 ไอโซเลท พบจุลินทรีย์ที่สามารถกรด 3-hydroxypropionic ได้สูงสุด 3 อันดับแรกคือ ไอโซเลท CC2 ให้ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้เท่ากับ 6.287 กรัมต่อลิตร ไอโซเลท CC7 ให้ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้เท่ากับ 5.567 กรัมต่อลิตร และไอโซเลท CA5 ให้ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้เท่ากับ 4.875 กรัมต่อลิตร

เมื่อนำมาทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ CC2, CC7 และ CA5 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 5 สูตร พบว่า ไอโซเลท CC2 และ CC7 ในอาหารสูตร Rich medium ให้ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้ดีที่สุด และมีสาร 1,3-propanediol รวมด้วยเล็กน้อย ไอโซเลท CA5 ในอาหารสูตร Mineral medium ให้ผลการผลิตกรด 3-hydroxypropionic ได้ดีที่สุด

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ โดยดูรูปร่างลักษณะของจุลินทรีย์ การติดสีแกรม ขนาด และลักษณะการจัดเรียงตัวของจุลินทรีย์ พบว่าไอโซเลท CC2 และ CC7 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น เป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ ส่วนไอโซเลท CA5 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง เป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ และ การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทั้ง 3 ไอโซเลท CC2, CC7 และ CA5 ไม่เกิดการย่อยเจลาติน มีการสร้างไลเปส ส่วนการหมักน้ำตาลสามารถเกิดการสร้างกรดและแก๊ส

จากผลการศึกษา พบว่าแหล่งดินและน้ำเสียที่พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol ได้ ส่วนใหญ่เป็นแหล่งดินและน้ำเสียที่ได้จากร้านอาหารเป็นหลัก เนื่องจากร้านอาหารมีการใช้น้ำมันเป็นส่วนประกอบหลัก โดยไขมันจะมีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ เมื่อเกิดการทับถมกันเป็นเวลานาน ทำให้เกิดจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้กลีเซอรอล ในบริเวณดังกล่าว และได้ผลพลอยได้เป็นกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อดูอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ และดูระยะเวลาที่ผลิตสารออกมา
2. ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic หรือสาร 1,3-propanediol เช่น ปริมาณเซลล์เริ่มต้น ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น
3. ควรศึกษาบริเวณ 16S rRNA ยีน เพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้



## เอกสารอ้างอิง

- Ahrens, K. Menzel, K. Zeng, A.P. and Deckwer, W.D. 1998. "Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation." *Biotechnology and Bioengineering*. 59 : 544-552.
- Ainala, S.K. Ashok, S. Ko, Y. and Park, S. 2013. "Glycerol assimilation and production of 1,3-propanediol by *Citrobacter amalonaticus* Y19." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(11) : 5001-5011.
- Arasu, M.V. Kumar, V. Ashok, S. Song, H. Rathnasingh, C. Lee, H.J. Seung, D. and Park, S. 2011. "Isolation and Characterization of the New *Klebsiella pneumoniae* J2B Strain Showing Improved Growth Characteristics with Reduced Lipopolysaccharide Formation." *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16 : 1134-1143.
- Barbirato, F. Grivel, J.P. Soucaille, P. and Bories, A. 1996. "3-hydroxypropionaldehyde an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Enterobacterial* species." *Applied and Environmental Microbiology*. 62 : 1448-1451.
- Barbirato, F. Himmi, E.H. Conte, T. and Bories, A. 1998. "1,3-propanediol production by fermentation An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries." *Industrial Crops and Products*. 7 : 281-289.
- Biebl, H. Marten, S. Hippe, H. and Deckwer, W.D. 1992. "Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated *Clostridia*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36 : 592-597.
- Biebl, H. Zeng, A.P. Menzel, K. and Deckwer, W.D. 1998. "Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50 : 24-29.
- Biebl, H. Menzel, K. Zeng, A.P. and Deckwer, W.D. 1999. "Microbial production of 1,3-propanediol." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52 : 289-297.
- Biebl, H. 2001. "Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27 : 18-26.
- Bokvajova, A. Burkhard, J. Demnerov, K. and Pazlarova, J. 1994. "Screening and Separation of Microorganisms degrading PCBs." *Environmental Health Perspectives*. 21 : 6-7.

- Cameron, DC. Altaras, NE. Hoffman, ML. and Shaw, A.J. 1998. "Metabolic engineering of propanediol pathways." *Biotechnology progame*. 14 : 116-25.
- Dabrock, B. Bahl, H. and Gottschalk, G. 1992. "Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*." *Applied and Environmental Microbiology*. 58 : 1233-1239.
- Daniel, R. Stuert, K. and Gottschalk, G. 1995. "Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*." *Journal of bacteriology*. 177 : 4392-4401.
- Daniel, R. Thomas, A.B. and Gottschalk, G. 1999. "Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and dioldehydratases and organization of the encoding genes." *Federation of European Microbiological Societies microbiology reviews*. 22 : 553-566.
- Da, Silva, G.P. Mack, M. and Contiero, J. 2009. "Glycerol : A promising and abundant carbon source for industrial microbiology." *Biotechnology advances*. 27: 30-39
- Drozdzyńska, A. Czaczyk, K. and Leja, K. 2011. "Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol." *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. 92(1) : 92-100.
- Drozdzyńska, A. Leja, K. and Czaczyk, k. 2011. "Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol." *Journal of Biotechnology*. 92(1) : 92-100.
- Durgapal, M. Kumar, V. Lee, H.J. Park, S. Seung, D. Park, S. and Yang, T.H. 2014. "of 1,3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumonia J2B*." *Bioresource Technology*. 159 : 223-231.
- Forage, R.G. and Foster, A.M. 1982. "Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumonia* functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and dioldehydratases." *Journal of bacteriology*. 149 : 413-419.
- González-Pajuelo, M. Meynial-Salles, I. Mendes, F. Soucaille, P. and Vasconcelos, I. 2006. "Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5)." *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1) : 96-101.
- Heo, S.Y. Kim, C.H. Kim, D.H. Luo, L.H. Oh, B.R. and Seo, J.W. 2013. "Identification and characterization of *Klebsiella pneumonia* aldehyde dehydrogenases increasing." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(3) : 697-703.
- HuangY, Li Z. Shimizu, K. and Ye, Q. 2013. "Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* expressing aldH under micro-aerobic conditions." *Bioresource Technology*. 128 : 505-512.

- Igari, S. Mori, S. and Takikawa, Y. 2000. "Effects of molecular structure of aliphatic diols and polyalkylene glycol as lubricants on the wear of aluminum." *Wear*. 244 : 180-184.
- Janda, J.M. Abbott, S.L. Cheung, W.K.W. and Hanson, D.F. 1994. Biochemical Identification of Citrobacteria in the Clinical Laboratory." *Journal of clinical microbiology*. 32 : 1850-1854.
- Jiang, X. Meng, X. and Xian, M. 2009. "Biosynthetic pathway for 3-hydroxypropionic acid production." *Apply Microbiology Biotechnol*. 82 : 995-1003.
- Jo, J.E. Park, S. Raj, S.M. and Rathnasingh, C. 2008. "Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain." *Bio-energy Production by Process Engineering Approach*. 43 : 1440-1446.
- Katrlík, J. Vostiar, I. Sefcovicova, J. Tkac, J. Mastihuba, V. Valach, M. Stefuca, V. and Gemeiner, P. 2007. "A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacteroxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 388(1) : 287-295.
- Knietsch, A. Bowien, S. Whited, G. Gottschalk, G. and Daniel, R. 2003. "Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase and dioldehydratase encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichmentcultures." *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3048-3060.
- Kosmider, A. and Czaczyk, K. 2009. "The prospects of use of glycerol in biotechnological processes." *Prospects Microbiology*. 48(4) : 277-287.
- Kosmider, A. Drozdzyńska, A. and Czaczyk, K. 2009. "The possible use of waste raw materials in propionic fermentation." *Food Science Technology*. 6(67) : 47-58.
- Kosmider, A. Drozdzyńska, A. Blaszką, K. Leja, K. and Czaczyk, K. 2010. "Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* using industrial wastes crude glycerol and whey lactose." *Polish Journal of Environmental Studies*. 19(6) : 1249-1253.
- Kumar, V. Ashok, S. and Park, S. 2013. "Recent advances in biological Production of 3-hydroxypropionic acid." *Biotechnology Advances*. 31 : 945-961.
- Leon, L.A. Canle, L.J. Garcia, L.J. Noia, L.J. and Munoz, D.E. 2011. "*Citrobacter freundii* infection after acute necrotizing pancreatitis in a patient with a pancreatic pseudocyst a case report." *Medical case reports*. 1 : 5:51.

- Liu, H.J. Zhang, D.J. Xu, Y.H. Mu, Y. Sun, Y.Q. and Xiu, Z.L. 2007. "Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumonia* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale." *Biotechnology letters*. 29 : 1281-1285.
- Luers, F. Seyfried, M. Daniel, R. and Gottschalk, G. 1997. "Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum* cloning and expression of the gene encoding 1,3- propanediol dehydrogenase." *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 154 : 337-345.
- Macis, L. Daniel, R. and Gottschalk, G. 1998. "Properties and sequence of the coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*." *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 164 : 21-28.
- Menzel, K. Zeng, A.P. and Deckwer, W.D. 1997. "High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumonia*." *Enzyme and Microbial Technology*. 20: 82-86.
- Mu, Y. Teng, H. Zhang, D.J. Wang, W. and Xiu, Z.L. 2006. "Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumonia* using crude glycerol from biodiesel preparations." *Biotechnology letters*. 28 : 1755-1759.
- Nakamura, C.E. Gatenby, A.A. Hsu, A.K. Reau, R.D. Haynie, S.L. and Diaz-Torres, M. 2000. "Method for the production of 1,3-propanediol of recombinant micro-organism." *United States Patent*. 6 : 013-494.
- Nakamura, C.E. and Whited, G. 2003. "Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol." *Current opinion in biotechnology*. 14: 454-4.
- Nemeth, A. Kupcsulik, B. and Sevelia, B. 2003. "1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumonia DSM2026*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19 : 659-663.
- Papanikolaou, S. Ruiz-Sanchez, P. Pariset, B. Blanchard, F. and Fick, M. 2000. "High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain." *Journal of Biotech*. 77 : 191-208.
- Petitdemange, E. Durr, C. Abbad-Andalousi, S. and Raval, G. 1995. "Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*." *Journal of Industrial Microbiology*. 1(15) : 498-502.
- Pina, C.D. Falletta, E. and Rossi, M. 2011. "A green approach to chemical building blocks The case of 3-hydroxypropanoic acid." *Green Chemistry*. 13 : 1624-1632.
- Raj, S.M. Rathnasingh, C. Jo, J.E. and Park, S. 2008. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli BL21* strain." *Process Biochemistry*. 43 : 1440-1446.

- Rehman, A. Matsumur, A.M. Nomura, N. and Sato, S. 2008. "Growth and 1,3-propanediol production on pretreated sunflower oil biodiesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*." *Current Research in Bacteriology*. 1(1) : 7-16.
- Revised and Emended. 1970. "Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reactions." *Journal Biotechnology Biochemical*. 31.
- Rywinska, A. 2010. "Application of crude glycerol in citric acid production by *Yarrowia Lipolyticawratislavia AWG 7*." *Biotechnology*. 9(2) : 13-22.
- Saint-Amans, S. Perlot, P. Goma, G. and Soucaille, P. 1994. "High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system." *Biotechnology letters*. 16 : 831-836.
- Saxena, R.K. Pinki, A. Saurabh, S. and Jasmine, I. 2009. "Microbial production of 1,3-propanediol recent developments and emerging opportunities." *Biotechnology advances*. 27 : 805-913.
- Sikarwar, A.S. and Batra, H.V. 2011. "Identification of *Klebsiella pneumoniae* by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies." *International Journal of Chemical Engineering*. 2 : 2.
- Tatiana, F. Ferreira, A. Roberta, R. Ribeiro, Claudia, M.S. Ribeiro, Denise, M.G. Freire, Maria, A.Z. and Coelho. 2012. "Evaluation of 1,3-Propanediol Production from Crude Glycerol by *Citrobacter freundii* ATCC 8090." *Chemical Engineering*. 27 : 120-127.
- Travers, R.S. Martin, P.A.W. And Reichelderfer, F.C. 1987. "Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp." *Applied and environmental microbiology*. 53 : 1263-1266.
- Werpy, T. and Petersen, G. 2004. "Top Value Added Chemicals From Biomass." *Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. 93 : 29-31.
- Willke, T. and Vorlop, K. 2008. "Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol." *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110 : 831-840.
- Xiu, ZL. 1999. "The analysis of microbial production of 1,3-propanediol." *Chemical industry*. 19 : 33-35.
- Yazdani, S.S. Gonzales, R. 2007. "Anaerobic fermentation of glycerol a path to economic viability for the biofuels industry." *Current opinion in biotechnology*. 18 : 213-218.
- Zeng, A.P. Biebl, H. Schlieker, H. and Deckwer, W.D. 1993. "Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumonia* regulation of reducing equivalent balance and product inhibition." *Enzyme and Microbial Technology*. 15 : 771-779.

- Zeng, A.P. Ross, A. Biebl, H. Tag, C. Guenzel, B. and Deckwer, W.D. 1994. "Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation." *Biotechnology and Bioengineering*. 44 : 902-911.
- Zeng, A.P. 1996. "Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*." *Bioprocess Engineering*. 14: 169-175.
- Zeng, A.P. and Biebl, H. 2002. "Bulk chemicals from biotechnology the case of 1,3-propanediol production and the new trends." *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*. 74 : 239-259.
- Zhang, G.L. Maa, B.B. XuaX, L. Chun, L. and Wang, L. 2007. "Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*." *Biochemical Engineering Journal*. 7 : 256-260.
- Zhu, M.M. Lawman, P.D. Cameron, D.C. 2002. "Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate." *Biotechnology progress*. 18 : 694-699.
- Zhu, J.G. Ji, X.J. Huang, H. Du, J. Li, S. Ding, Y.Y. 2009. "Production of 3-hydroxypropionic acid by recombinant *Klebsiella pneumoniae* based on aeration and ORP controlled strategy." *Korean Journal Chemical Engineering*. 26 : 1679-85.
- Wikipedia. 2013. **3-Hydroxypropionic acid**. [Online].  
Available : [https://en.wikipedia.org/wiki/3-Hydroxypropionic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/3-Hydroxypropionic_acid)

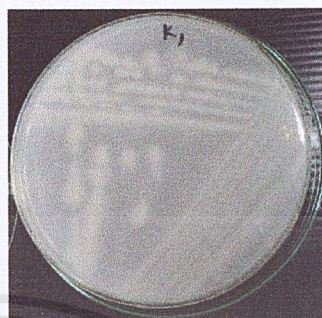
พูนสุข ประเสริฐสุวรรณ, ภาวดี เมธะคานนท์ และศุภลักษณ์ สัตยสมิตสถิต. 2008. "การคัดเลือกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลที่เหลือจากการผลิตไบโอดีเซล." การประชุมวิชาการ สวทช. ประจำปี 2550 เพิ่มความสุขและผลิตภาพประชาชาติด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ.

## ภาคผนวก ก

## 1. ลักษณะโคโลนีและการเกิดโซนใสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

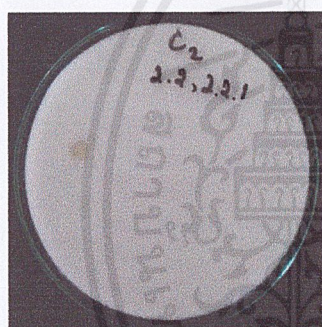


2.1

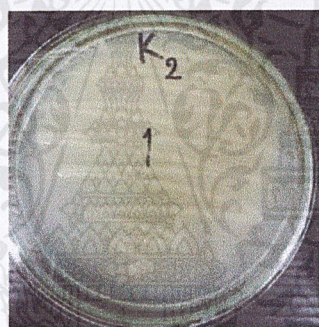


3.1

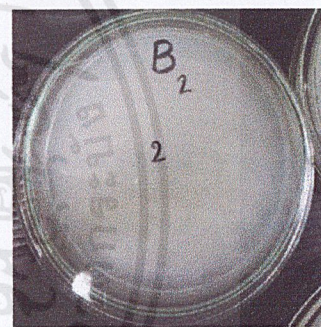
(ก)



2.2

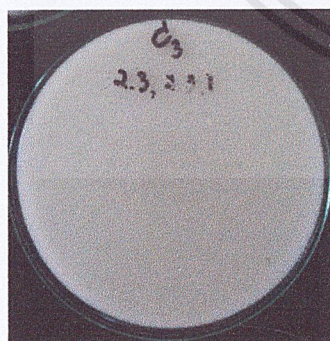


3.2

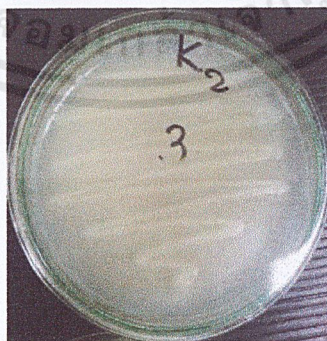


1.2

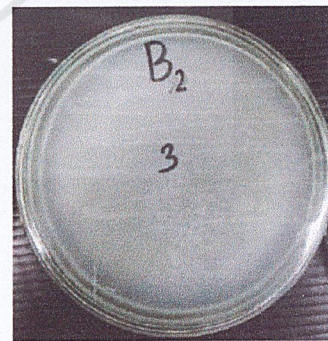
(ข)



2.3



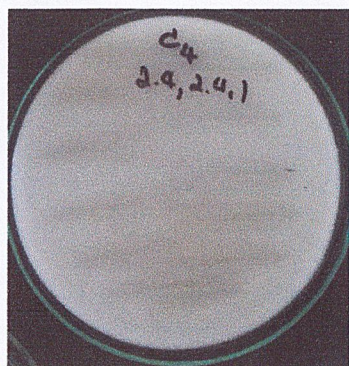
3.3



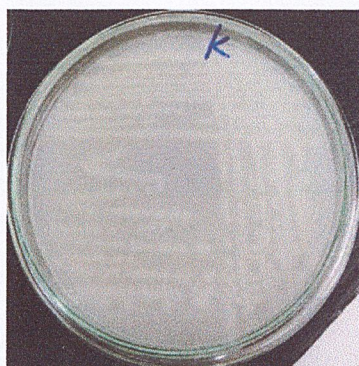
1.3

(ค)

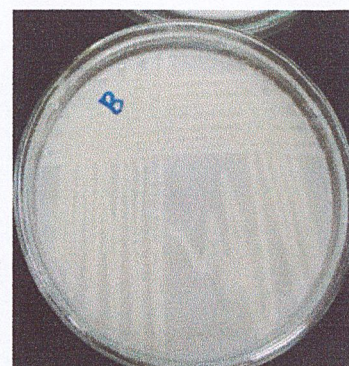
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.4

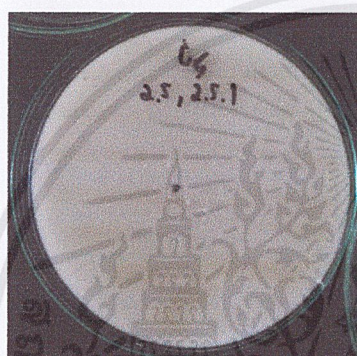


3.4



1.4

(ง)

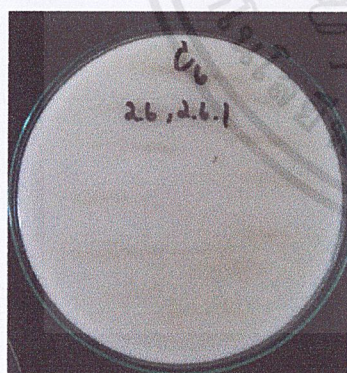


2.5



1.5

(จ)



2.6



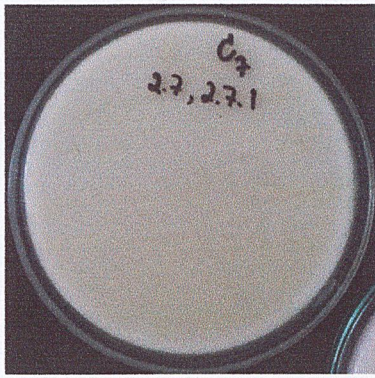
3.6



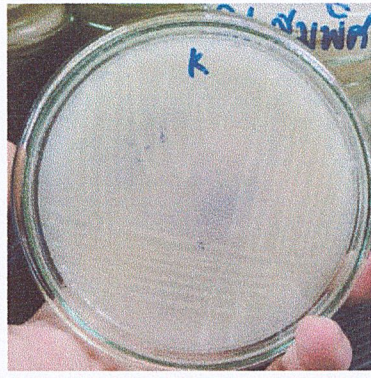
1.6

(ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

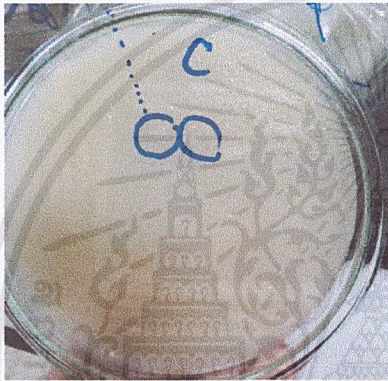


2.7

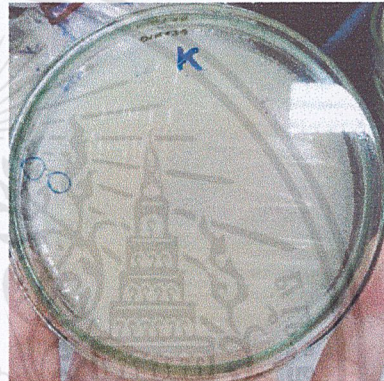


3.7

(ข)

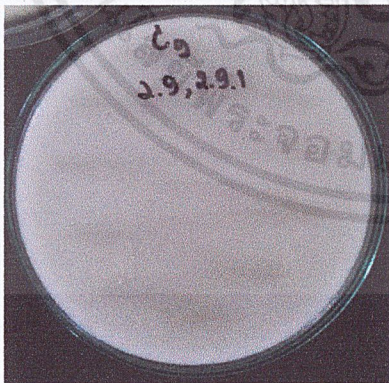


2.8



3.8

(ค)



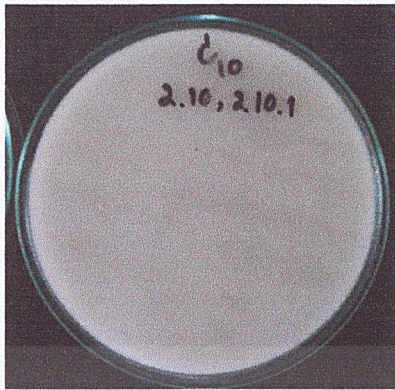
2.9



3.9

(ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.10



3.10

(ญ)

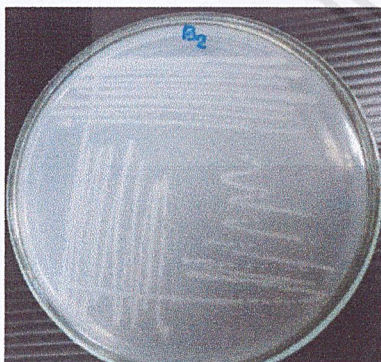


1.1

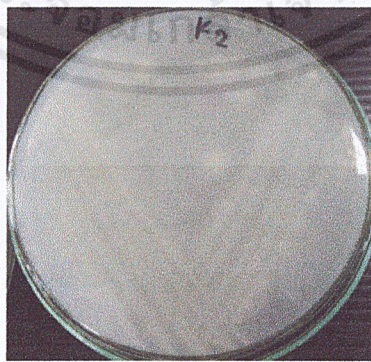


3.1

(ฎ)



1.2



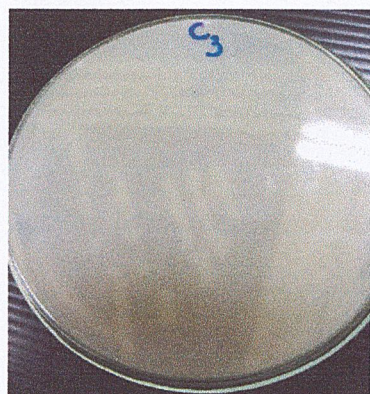
3.2



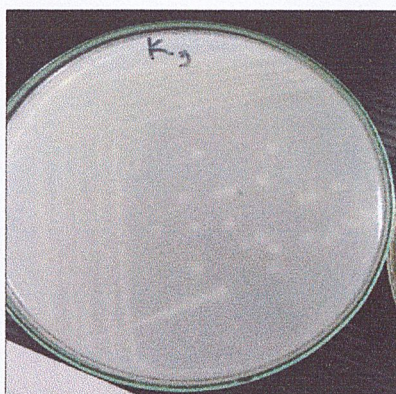
2.2

(ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

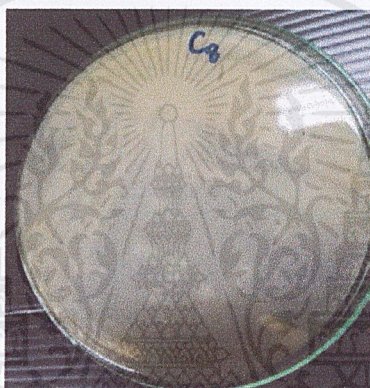


2.3



3.3

(ฐ)



2.8

(ฑ)

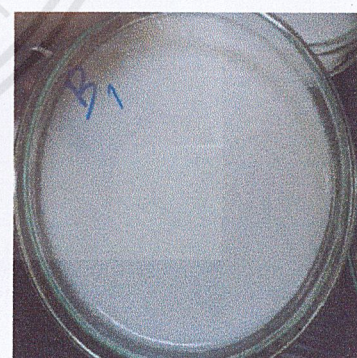


2.1



3.1

(ฒ)

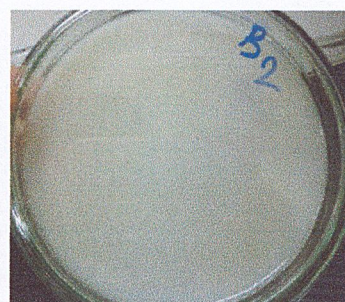


1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



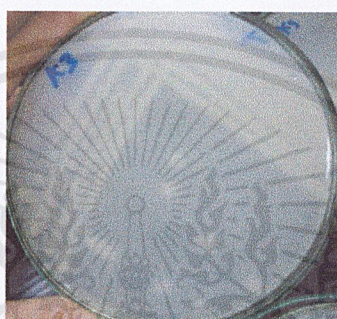
2.2

3.2  
(ณ)

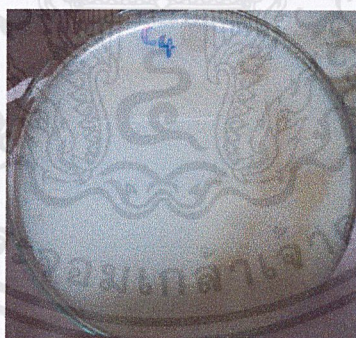
1.2



2.3

3.3  
(ด)

1.3

2.4  
(ต)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.5

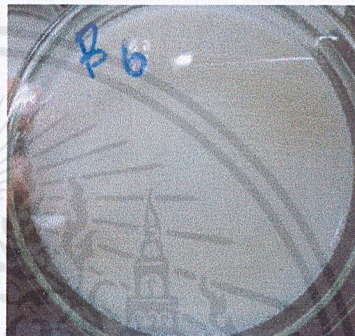
3.5

1.5

(ถ)



2.6



1.6

(ท)



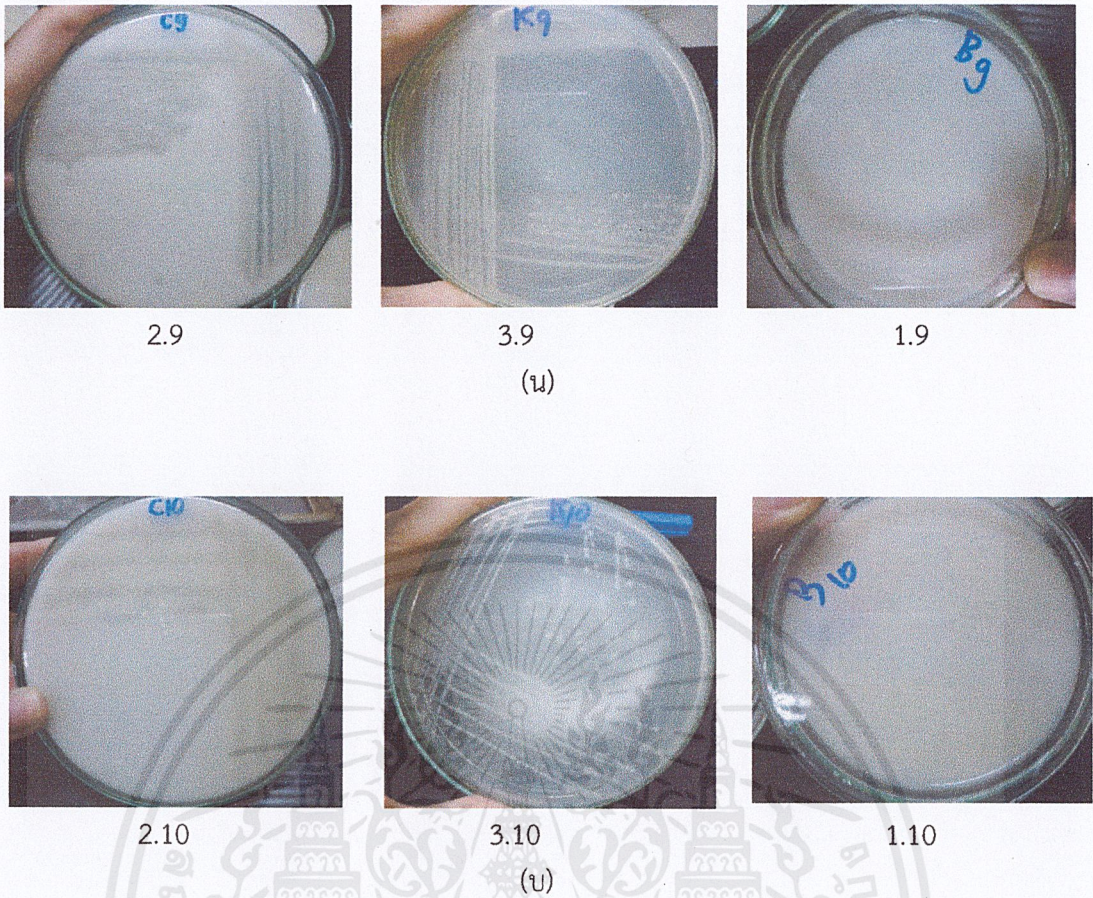
2.7



3.7

(ธ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีและการเกิดโซนใสของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ  
 (ก.)จังหวัดกระบี่ 1 (ข.)จังหวัดกระบี่ 2 (ค.)จังหวัดกระบี่ 3 (ง.)จังหวัดกระบี่ 4 (จ.)จังหวัด  
 กระบี่ 5 (ฉ.)จังหวัดกระบี่ 6 (ช.)จังหวัดกระบี่ 7 (ซ.)จังหวัดกระบี่ 8 (ณ.)จังหวัดกระบี่ 9 (ญ.)  
 จังหวัดกระบี่ 10 (ฎ.)กล้วยทอด 1 (ฏ.)กล้วยทอด 2 (ฐ.)กล้วยทอด 3 (ฑ.)กล้วยทอด 4 (ฒ.)  
 เก๊กี่ 1 (ณ.)เก๊กี่ 2 (ด.) เก๊กี่ 3 (ต.)เก๊กี่ 4 (ถ.)เก๊กี่ 5 (ท.)เก๊กี่ 6 (ธ.)เก๊กี่ 7 (น.)เก๊กี่ 8 (บ.)เก๊กี่ 9

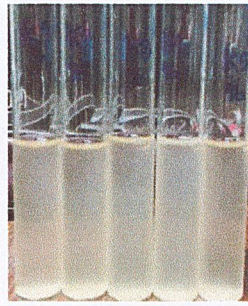
## 2. ลักษณะความขุ่นของจุลินทรีย์เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง



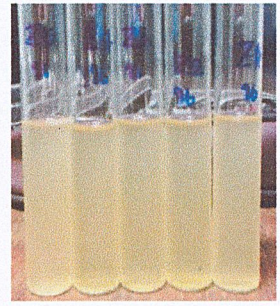
Mineral Salt



medium Rich medium

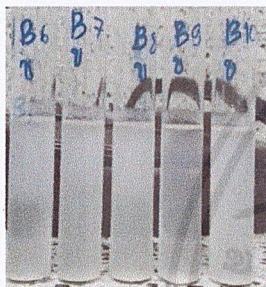


M9 medium



Mineral trace element

(ก) รูปภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ ไอโซเลทจากแหล่งดินกระบี่ในอาหารเหลว 4 สูตร สภาวะนิ่ง



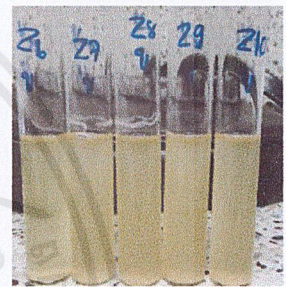
Mineral Salt



medium Rich medium



M9 medium



Mineral trace element

(ข) รูปภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ ไอโซเลทจากแหล่งดินกระบี่ในอาหารเหลว 4 สูตร สภาวะเขย่า



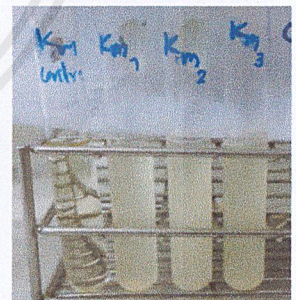
Mineral Salt



medium Rich medium



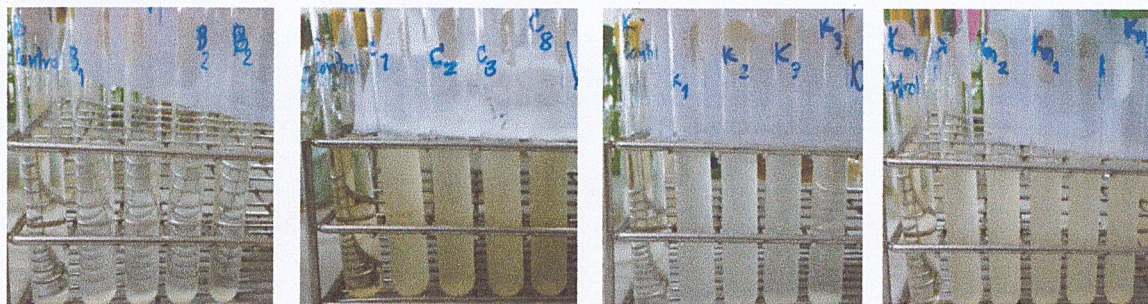
M9 medium



Mineral trace element

(ค) รูปภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ ไอโซเลทจากแหล่งดินกล้วยทอดในอาหารเหลว 4 สูตร สภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



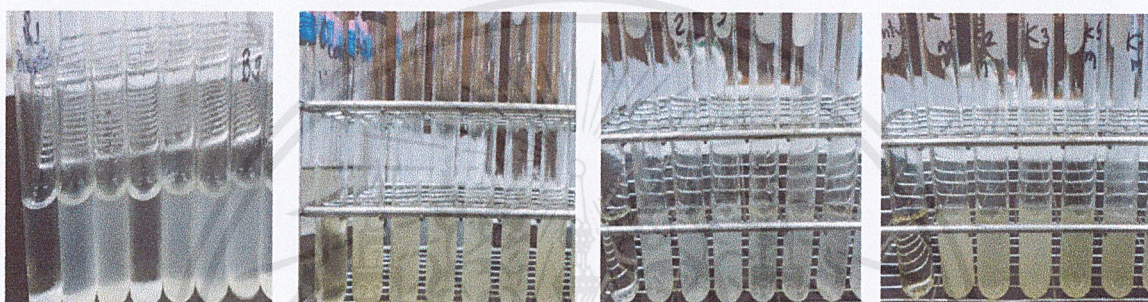
Mineral Salt

medium Rich medium

M9 medium

Mineral trace element

(ง) รูปภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ ไอโซเลทจากแหล่งดินกล้วยทอดในอาหารเหลว 4 สูตรในสภาวะเขย่า



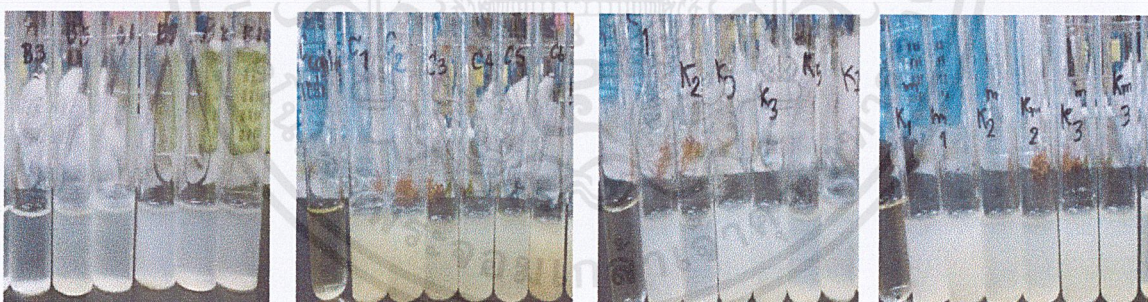
Mineral Salt

medium Rich medium

M9 medium

Mineral trace element

(จ) รูปภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ ไอโซเลทจากแหล่งดินเก็กงามในอาหารเหลว 4 สูตรในสภาวะนิ่ง



Mineral Salt

medium Rich medium

M9 medium

Mineral trace element

(ฉ) รูปภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ ไอโซเลทจากแหล่งดินเก็กงามในอาหารเหลว 4 สูตรในสภาวะเขย่า

## รูปที่ 2 การเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลทจากแหล่งดินในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

#### 3.1 การศึกษาการสร้าง exoenzymes



CA

CC

KC

(ก) รูปภาพแสดงกระบวนการย่อยแป้งของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC



CA

CC

KC

(ข) รูปภาพแสดงกระบวนการย่อยคาซิอินของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC



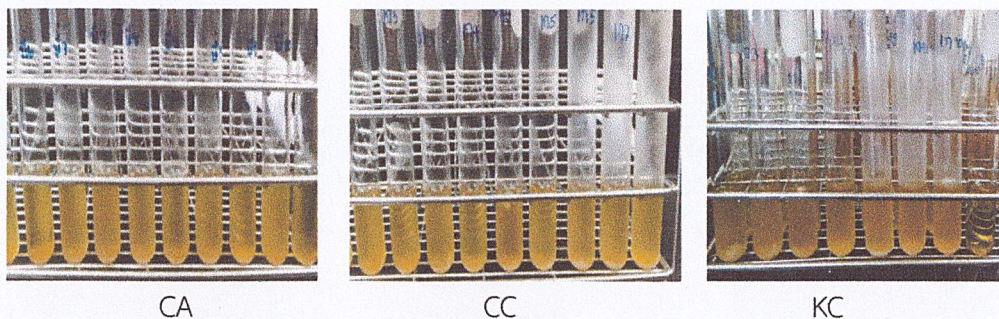
CA

CC

KC

(ค) รูปภาพแสดงกระบวนการย่อยน้ำมันของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



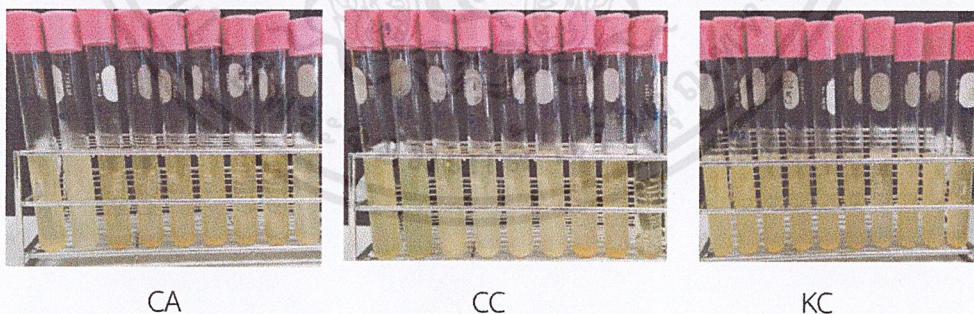
(ง) รูปภาพแสดงกระบวนย่อยเจลาตินของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC

รูปที่ 3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี การศึกษาการสร้าง exoenzymes จากแหล่งดินกระบี่และดินเกี๋ยรมราช

### 3.2 การทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ

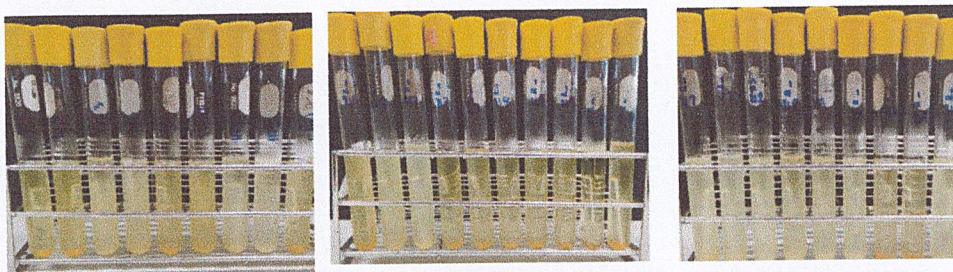


(ก) รูปภาพแสดงการหมักน้ำตาลกลูโคสของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC



(ข) รูปภาพแสดงการหมักน้ำตาลแลคโตสของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

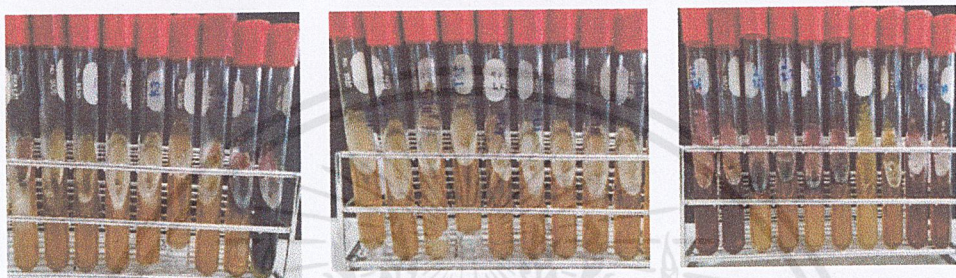


CA

CC

KC

(ค) รูปภาพแสดงการหมักน้ำตาลซูโครสของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC



CA

CC

KC

(ง) รูปภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงใน TSI ของไอโซเลทในกลุ่ม CA, CC และ KC

รูปที่ 4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี การทดสอบการใช้สารอาหารชนิดต่างๆ จากแหล่งดินกระบี่และดินเกี๋ยมราช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้