รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

Optimization of 3-hydroxypropionic acid production by isolated bacterium strain PN1

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

Optimization of 3-hydroxypropionic acid production by isolated bacterium strain PN1

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

ทะเบียน 145940
11 เมย. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2558 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 50,000 **บาท**

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **ตั้งแต่วันที่** 1 ตุลาคม 2557 **ถึงวันที่** 30 กันยายน 2558

หัวหน้าโครงการ นางสาวสมพิศ สอนโยธา **ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณลาดกระบัง และมีความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ถูกจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16s rRNA ซึ่งผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 99 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของอาหาร (Minimal medium, Rich medium, Mineral medium, Bioreactor medium และ Culture medium) สภาวะการเพาะเลี้ยง (สภาวะเขย่าและสภาวะนิ่ง) ความเร็วรอบในการเขย่า (0, 25, 50, 75 และ 150 รอบต่อนาที) และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (ร้อยละ 0, 1, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3- ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 มีแนวโน้มในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Rich medium ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 75 รอบต่อนาที และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

คำสำคัญ : กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค แบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สภาวะที่เหมาะสม *Klebsiella pneumoniae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Optimization of 3-hydroxypropionic acid production by isolated bacterium strain PN1

Researcher: Dr.Somphit SORNYOTHA

Faculty: Science **Department:** Biology

ABSTRAC

A bacterium strain PN1, isolated from soil at cafeteria of faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang produces 3-hydroxypropionic acid when grown in medium containing glycerol as the carbon source. The strain PN1 was identified by using morphological properties and 16S rRNA gene analysis. The results showed that it was closely related to *Klebsiella pneumoniae* with 99% sequence similarity. In addition, the effect of medium (Minimal medium, Rich medium, Mineral medium, Bioreactor medium and Culture medium), cultivation condition (shaking and static conditions) shaker agitation rate (0, 25, 50, 75 and 150 rpm) and concentration of calcium carbonate (0, 1, 5, 10 and 15% (w/v)) on 3-hydroxypropionic acid production were examined. The result showed that the strain PN1 had a tendency to produce 3-hydroxypropionic acid at high concentration when grown in Rich medium containing glycerol as a carbon source incubated with shaking condition at 75 rpm in the presence of 1% (w/v) calcium carbonate.

Keywords : 3-Hydroxypropionic acid, Bacterium strain PN1, Optimal conditions, *Klebsiella pneumoniae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกและคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งต่อความอนุเคราะห์ในครั้งนี้และขอพระขอบคุณเป็นอย่างสูง นอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณเงินรายได้สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 กรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค (3-hydroxypropionic acid)	5
2.1.1 ความสำคัญของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	5
2.1.2 กระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคจากกลีเซอรอล	6
2.1.3 กระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคจากกลูโคส	9
2.2 แนวโน้มในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคโดยจุลินทรีย์	10
2.2.1 การสร้างโฮสต์โดยใช้ *dha* operon	10
2.2.2 กรณีใช้เชื้อ *Escherichia coli* เป็นโฮสต์	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.3 กรณีใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นโฮสต์	12
2.2.4 การใช้จุลินทรีย์อื่นๆ เป็นโฮสต์	14
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรด	16
2.4 การประยุกต์ใช้กรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	17
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง	20
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	22
3.3 แหล่งของแบคทีเรีย	23
3.4 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย	23
3.4.1 อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (M9 Broth)	23
3.4.2 อาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (M9 Agar)	23
3.4.3 อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3- ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	23
3.4.3.1 Minimal medium – สูตรที่ 1	23
3.4.3.2 Rich medium – สูตรที่ 2	24
3.4.3.3 Mineral medium – สูตรที่ 3	24
3.4.3.4 Bioreactor medium – สูตรที่ 4	25
3.4.3.5 Culture medium – สูตรที่ 5	25
3.5 การสกัด Genomic DNA จากแบคทีเรีย	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6 การเพิ่มปริมาณ 16S DNA โดยใช้เทคนิค PCR	27
3.7 การทำ 16S DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick® PCR Purification Kit	28
3.8 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1	29
3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	29
3.9.1 การเตรียมแบคทีเรียตั้งต้น	29
3.9.2 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	30
3.9.3 การศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรด3-ไฮดรอกซี-โพรพิโอนิค	30
3.9.4 การศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ต่อการผลิตกรด 3-ไฮ-ดรอกซีโพรพิโอนิค	30
3.10 การเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอ-นิคและสารอื่นๆที่เกี่ยวข้อง	30
3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคและสารเมทาบอไลต์ต่างๆ ในน้ำเลี้ยง	31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	32
4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานทั่วไปของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1	32
4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1	33
4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1	34
4.4 การศึกษาอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอก-ซีโพรพิโอนิค	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	40
4.6 การศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซี-โพรพิโอนิค	42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	45
5.1 สรุปผลการวิจัย	45
5.2 ข้อเสนอแนะ	46
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	47
6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	53
ภาคผนวก ก หลักฐานเอกสารอ้างอิงสำหรับรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด	54
ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย	58
ประวัตินักวิจัย	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงอนุพันธ์ของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค และการนำไปใช้ประโยชน์	6
2.2 ผลผลิต ATP และความเป็นไปได้ของการเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานเทอร์โมไดนามิกของการใช้กลูโคสในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	10
2.3 การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคจากกลีเซอรอลโดยใช้ *dha* operon และใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นโฮสต์	14
2.4 การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคจากกลีเซอรอลโดยใช้ *dha* operon และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเป็นโฮสต์	15
3.1 แสดงสภาวะขั้นตอนต่างๆ ในการใช้ตัวอย่างเข้าเครื่อง DNA thermal cycle	28
4.1 แสดงผลการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคและ 1,3-โพรเพนไดออล ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เลี้ยงในอาหาร 5 สูตรในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	37
4.2 แสดงการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 (Rich medium) และเขย่าด้วยความเร็วรอบที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	41
4.3 แสดงการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2 (Rich medium) ในขวดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เติมปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	5
2.2 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออลและกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค	7
2.3 ขั้นตอนการสร้างกรด 3- ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค และ 1,3-โพรเพนไดออล	9
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	32
4.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1	34
4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตและปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (กรด 3-HP) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	35
4.4 แสดงการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิค และ 1,3-โพรเพนไดออลของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 5 สูตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	38
4.5 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิคและสาร 1,3-โพรเพนไดออล	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัญหาการลดลงอย่างรวดเร็วของ fossil resources ซึ่งสวนทางกับปริมาณความต้องการใช้ที่พุ่งขึ้นสูงเป็นอย่างมาก จึงส่งผลทั้งต่อภาคการขนส่งและส่งผลต่อปริมาณที่ลดลงของสาร petrochemical และส่งผลกระทบต่อเนื่องไปยังสิ่งต่าง ๆ ที่ใช้สาร petrochemical เหล่านี้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอีกด้วย ดังนั้น US Department of Energy (DOE) จึงได้เล็งหาสาร bio-based platform chemicals ขึ้นมาเพื่อทดแทนสาร petrochemistry-based platform chemicals เหล่านี้ และหนึ่งในจำนวนสารเหล่านั้นได้แก่กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (3-hydroxypropionic acid หรือ 3-hydroxypropanoate หรือ กรด 3-HP) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญและกำลังได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคถูกจัดอยู่สามอันดับแรกของ bio-based platform chemicals จากทั้งหมด 12 สารเคมี ซึ่งคัดเลือกโดย US Department of Energy (DOE) (Werpy และ Petersen, 2004)

กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ มากมาย อาทิ เช่น acrylic acid, 1,3-propanediol, methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-HP, malonic acid, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น นอกจากนี้กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ยังสามารถใช้เป็น cross-linking agent สำหรับ polymer coating หรือใช้เป็น antistatic agent สำหรับอุตสาหกรรมสิ่งทอ หรือแม้กระทั่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต biodegradable polymer ซึ่งใช้ทดแทน petrochemistry-based polymer ได้อีกเช่นกัน (Zhu และคณะ, 2004) ซึ่งเห็นได้ว่ากรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคมีประโยชน์มากมายเป็นอย่างยิ่งและสามารถใช้เป็น building block ในการผลิตสารต่าง ๆ ทดแทนการใช้ petrochemistry-based platform chemical ได้เป็นอย่างดี

ในปัจจุบันมีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคทั้งโดยกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ แต่กระบวนการทางเคมีนั้นใช้สารตั้งต้นที่มีราคาสูง อีกทั้งปริมาณของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคที่ได้ก็ยังไม่มากพอ รวมทั้งบางกระบวนการผลิตมีสารพิษ (โซเดียมไซยาไนด์) ร่วมด้วย (Pina และคณะ, 2011) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ดังนั้นกระบวนการผลิตทางชีวภาพโดยอาศัยจุลินทรีย์นั้นจึงได้รับความความสนใจและกำลังได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และจากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการพัฒนาและตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรด 3-ไฮ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดรอกซีโพรไพโอนิคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยเหตุนี้ย่อมเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคในประเทศไทย เพราะต้องลงทุนสูงเพื่อซื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มาผลิตกรด 3-ไฮดรอก-ซีโพรไพโอนิค และการซื้อขายก็มิได้เป็นไปอย่างขายขาด อีกทั้งการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่ได้รับการตัดต่อทางพันธุกรรมยังไม่ได้ถูกยอมรับในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อความมั่นคงและยั่งยืนทางเศรษฐกิจประกอบกับอาศัยความได้เปรียบทางความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากดิน โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ถึง 4.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าที่มีรายงานในปัจจุบันที่พบว่า *Lactobacillus collinoides* 17 ซึ่งเป็นแบคทีเรียปกติ (wild type) สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้เพียง 2.8 กรัมต่อลิตร (Kumar และคณะ, 2013) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ให้สูงขึ้นอย่างน้อยร้อยละ 25 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาและต่อยอดในผลิตกรด 3-ไฮ-ดรอกซีโพรไพโอนิคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 อย่างน้อยร้อยละ 25

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 จำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

1.3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 และระยะเวลาในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

1.3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 เตรียมแบคทีเรียตั้งต้น โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว M9 (M9 borth) (Ko และคณะ, 2012) ซึ่งประกอบไปด้วย Magnesiumsulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.25 กรัมต่อลิตร Ammonium chloride (NH_4Cl) 1 กรัมต่อลิตร Sodium chloride (NaCl) 1 กรัมต่อลิตร Yeast extract 1 กรัมต่อลิตร และ Glycerol 9.2 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความขุ่นของเซลล์เทียบกับ Mcfarland

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

standard no.5 ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อปรับให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/ml (McFarland, 1907)

1.4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 โดยการนำแบคทีเรียตั้งต้นที่เตรียมได้ในข้อ 1.4.1 ไปเติมลงในอาหารเหลว โดยใช้แบคทีเรียเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการตรวจสอบหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและตรวจสอบการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิกค ซึ่งการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทำได้โดยการนำตัวอย่างมาทำ 10 fold dilution แล้วนำไป spread บนอาหารแข็ง (M9 agar) ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีเดี่ยวในช่วง 30-300 โคโลนี เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อต่อไป และการตรวจสอบการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองผ่านตัวกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

1.4.3 จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยวิธีทางชีวสารสนเทศ

1.4.4 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยการนำแบคทีเรียตั้งต้นที่ได้ (หัวข้อ 1.4.1) ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร 5 สูตรซึ่งแต่ละสูตรใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยอาหารแต่ละสูตรที่ทำการศึกษาคือ Minimal medium – สูตรที่ 1 (Drożdżyńska และคณะ, 2014) Rich medium – สูตรที่ 2 (Saxena และคณะ, 2009) Mineral medium – สูตรที่ 3 (Boenigk และคณะ, 1993) Bioreactor medium – สูตรที่ 4 (Drożdżyńska และคณะ, 2014) และ Culture medium – สูตรที่ 5 (Huang และคณะ, 2013) ที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อนาที และที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

1.4.5 ศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรด3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารตามข้อ 1.4.4 โดยเลือกสูตรอาหารที่มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพ-โอนิคสูงสุด จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันคือ 0, 25, 50, 75 และ 150 รอบต่อนาที เพื่อหาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

1.4.6 ศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารและความเร็วรอบที่มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดตามข้อ 1.4.5 โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลงในอาหารดังกล่าว ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 0, 1, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

1.4.7 นำน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจาก supernatant และนำตัวอย่างที่เป็น supernatant มากรองด้วย Syringe filters ที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน ส่วนใสที่กรองแล้วจะเก็บอยู่ในขวด vial เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ เช่น กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค, glycerol และ 1,3-propanediol เป็นต้น โดยใช้เครื่อง HPLC ต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และข้อมูลที่ได้อาจใช้เป็นแนวทางสำหรับกระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคในอนาคตต่อไป

1.5.2 สามารถลดการนำเข้าและลดการใช้สารเคมีสำหรับกระบวนผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์สารหล่อลื่น และสารป้องกันไฟฟ้าสถิตสำหรับสิ่งทอ เป็นต้น

1.5.3 สามารถนำของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และได้ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

1.5.4 สามารถเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และสามารถผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาตรีได้อย่างน้อย 3 คน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

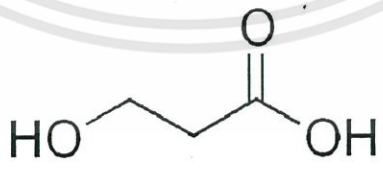
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (3-hydroxypropionic acid)

2.1.1 ความสำคัญของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (รูปที่ 2.1) เป็นสารที่น่าสนใจในเชิงการค้าและจัดเป็นสารที่มีความสำคัญลำดับต้นๆของ building blocks จากทั้งหมด 12 ชนิด เนื่องจากกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบต้าจึงเหมาะที่จะใช้ในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้งานต่างๆ เช่น อะคริลิค (acrylicacid) 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) เมทธิลอะครีเลท (methylacrylate) อะคริลาไมด์ (acrylamide) กรดเอทธิล 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (ethyl 3-hydroxypropionic acid) กรดมาโลนิค (malonicacid) โพรไพโอแลคโตน (propiolactone) และอะคริโลไนไตรล์ (acrylonitrile) เป็นต้น ซึ่งสารอนุพันธ์ของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สารเคลือบ สารหล่อลื่น สารป้องกันการเกิดไฟฟ้าสถิตในสิ่งทอ วัสดุตกแต่งศัลยกรรม และสารประกอบในอุตสาหกรรมยา เป็นต้น (ตารางที่ 2.1) (Kumar และคณะ, 2013) ในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสามารถผลิตทั้งจากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพโดยสามารถใช้สารตั้งต้นที่นำมาผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้มากมาย เช่น กลีเซอรอล 3-ไฮดรอกซีโพรพานอลดีไฮด์ (3-hydroxypropanaldehyde) กรดมาโลนิค (malonic acid) กรดอะคริลิค (acrylic acid) 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) กรดแลคติค (lactic acid) มาโลนิคเซมิแอลดีไฮด์ (malonicsemialdehyde) อะคริลาไมด์ (acrylamide) อัลลิลแอลกอฮอล์ (allylalcohol) 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอไนไตรล์ (3-hydropropionitrile) และเบตาโพรไพโอแลคโตน (β-propiolactone) เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค
ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/3-Hydroxypropionic_acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงอนุพันธ์ของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และการนำไปใช้ประโยชน์

สารอนุพันธุ์	กระบวนการผลิต	การนำไปใช้
กรดอะคริลิก	ดีไฮเดรชัน	อุตสาหกรรมสิ่งทอ สี กระดาษ กาว โพลิเมอร์
1,3-โพรเพนไดออล	รีดักชัน	กาว วัสดุศัลยกรรมตกแต่ง โพลิเอทิลีน เทเรฟทาเลต ผลิตภัณฑ์เส้นใยและสิ่งทอ
3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์	รีดักชัน	อาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ สารกันบูดในอุตสาหกรรมอาหาร

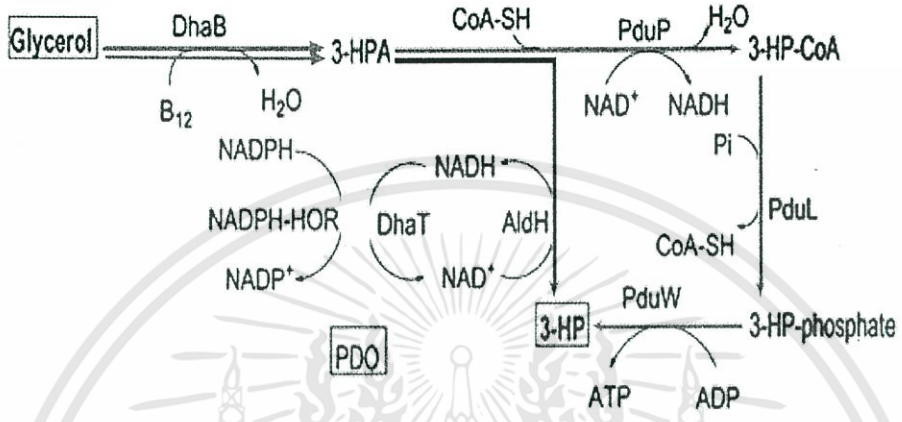
ที่มา: Kumar และคณะ (2013)

2.1.2 กระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอล

การหมักของจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก ไปเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าสูงเช่น 1,3–โพรเพนไดออล ไดไฮดรอกซี อะซีโตนเอททานอล ซัคซิเนต และกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค เป็นต้น ในการศึกษานี้ใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นแทนแหล่งน้ำตาล เช่น ซูโครส กลูโคส กระบวนการหมักกลีเซอรอลสามารถผลิตได้ผลตอบแทนที่สูงกว่ากระบวนการหมักของน้ำตาลทั่วไป กิจกรรมดังกล่าวมีความเป็นไปได้เนื่องจากระดับการลดลงของคาร์บอนในกลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$: k = 4.67) มีระดับนัยสำคัญสูงกว่าการใช้น้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$: k = 4) หรือไซโลส ($C_5H_{10}O_5$: k = 4) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอลไปเป็นฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (PEP) หรือ ไพรูเวท จะถูกผลิตขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส และกลีเซอรอลที่ผลิตได้จากการหมักของจุลินทรีย์ และการสังเคราะห์จากสารเคมียังมีอยู่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้มีราคาถูกกว่ามากเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้กลีเซอรอลยังเป็นผลพลอยได้จากการผลิตสบู่และไบโอดีเซล จากข้อได้เปรียบเหล่านี้เองจึงทำให้กลีเซอรอลได้กลายเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตสารเคมีต่างๆผ่านกระบวนการหมักจากการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม *Citrobacter* sp. *Clostridium* sp. *Enterobacter* sp. *Klebsiella* sp. และ *Lactobacillus* sp. แบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้กลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้ว 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-PDO) มักเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมที่เกิดขึ้น และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *K. pneumoniae* *L. reuteri* และ *L. collinoides* สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้โดยการออกซิไดซ์ 3-HPA พร้อมกับการสร้าง 1,3-PDO (Garai-Ibabe และคณะ, 2008; Krauter และคณะ, 2012; Sobolov และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 1960; Talarico และคณะ, 1988) โดยการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอล ประกอบไปด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ผ่าน 2 วิถี ได้แก่วิถี CoA-dependent และ CoA-independent แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออลและกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kumar และคณะ (2013)

การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยวิถี CoA-dependent สามารถพบได้ในแบคทีเรีย *L. reuteri, L. collinoides, Salmonella enteric* และ *K. pneumoniae* (Yasuda และคณะ, 2007) โดยใน *S. enteric* มี 1,2–โพรเพนไดออล (1,2-PDO) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญและต้องอาศัยการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เรียกว่า propanediol utilization (*pdu*) ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในการย่อยสลาย 1,2-โพนเพนไดออล โดย 1,2-โพรเพนไดออล จะถูกเปลี่ยนไปเป็น propionaldehyde ด้วยเอนไซม์ dioldehydratase โดยมี B12 เป็น Coenzyme หลังจากนั้น propionaldehyde จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น propanol และ propionic acid ด้วยเอนไซม์ เช่น propanoldehydrogenase CoA-dependentpropionaldehyde dehydrogenase (PduP) phosphotransacylase (PduL) และ propionate kinase (PduW) (Leal และคณะ, 2003; Liu และคณะ, 2007; Xue และคณะ, 2008) ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆในวิถี CoA-dependent มีดังต่อไปนี้

Glycerol ⟶ 3-HPA ⟶ 3-HP-CoA ⟶ 3-HP-phosphate ⟶ 3-HP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยวิถี CoA-independent โดยปฏิกิริยาขั้นตอนแรกของวิถี CoA-independent เป็นการเปลี่ยน glycerol เป็น 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์ โดยมีเอนไซม์ Glycerol-dehydratase (GDHt) เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาปฏิกิริยานี้สามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้เอนไซม์ dioldehydratase ได้เช่นกัน เอนไซม์ GDHt ในวิถีนี้อยู่ในรูปแบบ Coenzyme B12-independent แต่ GDHt ยังไม่มีการนำไปใช้ในการผลิต 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเพราะค่อนข้างไวต่อออกซิเจนเนื่องจากการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค จะเป็นไปได้ตามปกติภายใต้สภาวะการจำกัดการให้อากาศ เอนไซม์ อีกตัวหนึ่งได้แก่ aldehyde dehydrogenase (AldH) ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันของ 3-HPA ไปเป็น 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค การทำงานของเอนไซม์ยังคงต้องการ NAD^+ และ NAD^+ สามารถถูกนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิด เช่น *K. pneumoniae* และ *Lactobacillus* sp. พบ ALDHs แต่ยังเกิดกิจกรรมการทำงานไม่สูงมากนักดังนั้น การแสดงออกของ ALDHs สูงจึงมีความจำเป็นต่อประสิทธิภาพในการผลิต 3-ไฮดรอก-ซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอล

สำหรับขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆในวิถี CoA-independent pathway มีดังต่อไปนี้

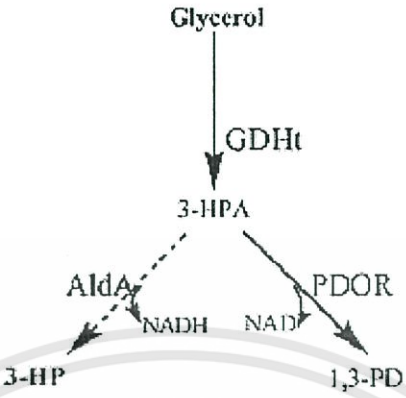
Glycerol ⟶ 3-HPA ⟶ 3-HP

นอกจากนี้ยังพบกระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และ1,3-โพรเพนไดออลร่วมกันโดยการสังเคราะห์อาศัยปฏิกิริยาสองขั้นตอนดังนี้ (รูปที่ 2.3)

ขั้นตอนที่ 1 การเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ glyceroldehydratase (GDHt) ทำหน้าที่เปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์ (3-HPA)

ขั้นตอนที่ 2 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและ 1,3-โพรเพนไดออล โดยเฉพาะในกระบวนการหมักกลีเซอรอลและไม่มีน้ำตาลกลูโคส ในขณะที่การสร้าง 1,3 โพรเพนไดออลจะสูงขึ้นและกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจะต่ำลงเมื่อมีการเติมกลูโคสลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการสร้างกรด 3- ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และ 1,3-โพรเพนไดออล
ที่มา: Zhu และคณะ (2009)

2.1.3 กระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลูโคส

ได้มีการศึกษาการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้นต้น โดยบริษัท Cargill ซึ่งอาศัยการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Escherichia coli* และยีสต์ สำหรับกระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค จากกลูโคสสามารถผลิตได้โดยวิถีทางชีวเคมีทั้งหมด 7 วิถี (ตารางที่ 2.2) โดยไพรูเวทและฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (PEP) เป็นสารตัวกลางหลักในกระบวนการผลิตกรด 3- ไฮดรอกซี-โพรไพโอนิคทั้ง 7 วิถี ปฏิกิริยาภายในเซลล์เมื่อกลูโคส 1 โมล ถูก ออกซิไดส์จะเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท 2 โมล และจะเกิด NADH และ ATP อย่างละ 2 โมล อย่างไรก็ตาม ปริมาณ ATP สุทธิที่ได้จะขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในแต่ละวิถี (Kumar และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ผลผลิต ATP และความเป็นไปได้ของการเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานเทอร์โมไดนามิกของการใช้กลูโคสในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

Metabolic pathway	Net ATP yield[a] (mol/mol 3-HP)	Thermodynamic feasibility
I (Pyruvate → lactate → lactoyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	1/0	Unfavorable
II (Pyruvate → acetyl-CoA → malonyl-CoA → 3-oxopropanoate → 3-HP)	0	Favorable
III (Pyruvate/PEP → OAA → aspartate → β-alanine → 3-oxopropanoate → 3-HP)	1/0	Favorable
IV (Pyruvate/PEP → OAA → aspartate → β-alanine → β-alanyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	0/−1	Unfavorable
V(Pyruvate/PEP → succinate → propionate/propionyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	−1/−0.33	Unfavorable
VI (Pyruvate → α-alanine → β-alanine → 3-oxopropanoate → 3-HP)	1	Favorable
VII (Pyruvate → α-alanine → β-alanine → β-alanyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	1/0	Unfavorable

ที่มา: Kumar และคณะ (2013)

2.2 แนวโน้มในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยจุลินทรีย์

2.2.1 การสร้างโฮสต์โดยใช้ *dha* operon

Matsakas และคณะ (2014) ได้ทำการสร้างโฮสต์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยใช้ *dha* operon และใช้โฮสต์ 2 ชนิดคือ ชนิดที่1 ใช้ *Escherichia coli* เป็นโฮสต์เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น ง่ายต่อการทำให้กลายพันธุ์เพราะมีความรู้ที่เกี่ยวกับพันธุกรรมของเชื้อที่ทำให้นำไปสู่การควบคุมการถ่ายโอนยีนให้เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพเป็นจำนวนมาก แต่ในทางกลับกันข้อเสียของเชื้อ *E. coli* คือไม่สามารถผลิตวิตามินบี 12 ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ glycerol dehydratase ดังนั้นต้นทุนที่เกี่ยวกับอาหารเลี้ยงเชื้อจึงสูงขึ้น (Luo และคณะ, 2011; Luo และคณะ, 2012) นอกจากนี้ *dha* operon เป็นกลุ่มยีนที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน CoA-independent pathway ซึ่งในธรรมชาติไม่มีอยู่ในจีโนมของเชื้อ *E. coli* (Suthers และคณะ, 2001) และใช้โฮสต์ชนิดที่ 2 คือ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งข้อได้เปรียบที่สำคัญคือ มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ จึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนปัญหาที่เกิดจากการนำ *K. pneumoniae* มาเป็นโฮสต์นั้นคือ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อที่มีการแสดงออกแบบ heterologous expression ซึ่งหมายความว่าสารที่ถูกผลิตออกมาจากเชื้อนี้มีมากกว่า 1 ชนิด ทำให้ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ของสารนั้นๆ มีความซับซ้อนมากขึ้น (Ashok และคณะ, 2011; Huang และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 กรณีใช้เชื้อ *Escherichia coli* เป็นโฮสต์

ความพยายามที่จะสร้างสายพันธุ์ *E. coli* ให้มีความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคนั้นจำเป็นต้องนำยีน *dhaB* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ glycerol dehydratase จากเชื้อ *K. pneumoniae* เข้าไปใส่ใน *E. coli* มี alds จำนวน 4 ยีนที่แตกต่างกัน ซึ่งประกอบด้วยยีน 2 ยีนจากเชื้อ *E. coli* (*aldA* และ *aldB*) 1 ยีนจากมนุษย์ (Homo sapiens) (*aldh2*) และอีก 1 ยีนมาจากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (*ald4*) ยีนที่ถูกสร้างขึ้นใน operon ถูกควบคุมภายใต้โปรโมเตอร์เดียวกัน การเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อใช้ยีน *ald4* สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสูงถึง 0.17 กรัมต่อลิตร แต่ว่าในทางอุตสาหกรรมยังถือว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคยังอยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นการสร้างสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคที่สูงกว่านี้จึงได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Ho และคณะ, 2005; Jo และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า AldH มีความต้องการ NAD^+ มากกว่า $NADP^+$ (มีกิจกรรมสูงขึ้นถึง 6 เท่า) ในขณะที่พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 8 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อ *E. coli* ต่อมาได้นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ซึ่งได้รับการถ่ายยีน *dhaB* จาก *K. pneumoniae* และยีน *aldH* จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 มาทำการเพาะเลี้ยง พบว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะให้อากาศสามารถผลิตได้เท่ากับ 0.58 กรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่าที่มีรายงานก่อนหน้านี้ แต่ก็ยังไม่สามารถใช้ได้ในเชิงพาณิชย์เนื่องจากเกิดการยับยั้งของยีน *dhaB* มีผลทำให้การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคหยุดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไปแล้ว 30 ชั่วโมง นักวิจัยจึงได้ทำการทดสอบปัจจัยของสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น พีเอช สาร IPTG และความเข้มข้นของกลีเซอรอล และ อัตราส่วนระหว่างค่า liquid-to-flask volume (L/F) เพื่อเพิ่มการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคให้สูงขึ้น (Raj และคณะ, 2009) โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนั้น (พีเอช 8.0 IPTG เท่ากับ 0.1 มิลลิลิตร และ L/F เท่ากับ 0.2) มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเพิ่มขึ้นเป็น 4.4 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้การหมักแบบ fedbatch ถ้าเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศด้านบนถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นร้อยละ 20 จะทำให้การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเพิ่มขึ้นเป็น 31 กรัมต่อลิตร และค่าผลได้โดยรวมคือ 0.35 กรัมของกรด 3-ไฮดรอก-ซีโพรไพโอนิคต่อกรัมของกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไป ซึ่งสามารถตอบสนองความต้องการสำหรับการใช้งานเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักนี้ยังพบผลิตภัณฑ์พลอยได้หลักคือ กรด 3-โพรไพโอนิค และ 1,3-โพรเพนไดออลอีกด้วย (Matsakas และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 กรณีใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นโฮสต์

Klebsiella pneumoniae เป็นจุลินทรีย์ธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายกลีเซอรอลผ่านวิถีรีดักชั่นหรือวิถีออกซิเดชั่นได้ ขั้นตอนแรกของวิถีออกซิเดชั่นจะเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นไดไฮดรอกซีอะซีโตน บทบาทของวิถีออกซิเดชันคือการสร้าง NADH ซึ่งจะถูกใช้ในกระบวนการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลและกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ (Luo และคณะ, 2011) ความพยายามที่จะเพิ่มคาร์บอนซึ่งมีผลต่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลและกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยลดการสร้างโดยผลิตภัณฑ์พลอยได้ในวิถีออกซิเดชั่น ด้วยเหตุนี้ *K. pneumoniae* จึงได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่โดยการกำจัดยีน *dhaD* และยับยั้งวิถีออกซิเดชั่นซึ่งส่งผลต่อปัญหาการขาดแคลน NADH ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับกิจกรรมของยีน *dhaT* และการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล เนื่องจากการเกิด NADH ภายในเซลล์ลดลง การแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase ยีน *aldHk* ซึ่งคล้ายคลึงกันกันกับยีน *ald*H จาก *E. coli* และต้องการ NAD^+ ซึ่งเป็นโคเอนไซม์มากกว่า $NADP^+$ การแสดงออกของยีน *aldHk* มากเกินไปนำไปสู่การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลเพิ่มขึ้น (เพิ่มขึ้นจาก 8.5 กรัมต่อลิตรเป็น 9.2 กรัมต่อลิตร) และกรด 3-ไฮดรอก-ซีโพรไพโอนิคได้ 6 กรัมต่อลิตร ภายใต้การหมักแบบ batch ในถังปฏิกรณ์ สำหรับภายใต้การหมักแบบ fedbatch การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลเพิ่มขึ้นเป็น 22.7 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตกรด 3-ไฮดรอก-ซีโพรไพโอนิคเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยคือ 6.8 กรัมต่อลิตร (Ashok และคณะ, 2011) การแสดงออกของยีน ald อื่นๆ เช่น NAD^+-dependent-glutamyl-dehydrogenase aminobutyraldehyde (*puuC*) ของเชื้อ *K. pneumoniae* ภายใต้การหมักแบบใช้ออกซิเจนเล็กน้อยในฟลาสก์ พบว่าค่าผลได้ในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคคือ 1.17 กรัมต่อลิตร และผลิต 1,3-โพรเพนไดออลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมได้ 1.75 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ยีน *dhaT* จึงถูกกำจัดเพื่อลดการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นผลิตภัณฑ์ 1,3-โพรเพนไดออลมากเกินไป ผลที่ได้คือการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพ-โอนิคเพิ่มมากขึ้นเป็น 3.65 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกันและการผลิตของ 1,3-โพร-เพนไดออลเพิ่มขึ้นเป็น 3.05 กรัมต่อลิตร ยีน *puuC* จาก *K. pneumoniae* มีการเร่งปฏิกิริยาสูงเมื่อใช้ valeraldehyde และ 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) เป็นสับสเตรท (Raj และคณะ, 2010) โดยสภาวะที่เหมาะสมคือที่พีเอช 8 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Huang และคณะ, 2012) นอกจากนี้พบว่าค่าผลได้ของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่ำลงเมื่อใช้ยีน *puuC* เปรียบเทียบกับยีน *aldH* อื่นๆ ที่ได้มาจาก *Zymomonas mobilis* (adhB) *Lactobacillus collinoides* (*aldH* และ *pduQ*) *E. coli* (*aldAaldH* และ*ydcW*) และ *K. pneumoniae* (*aldA aldB puuC ydcW etuE feaB gabD* และ *badH*) โดยยีนที่สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงในระหว่างการหมักแบบไร้ออกซิเจนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟลาสก์คือยีน *aldH* จาก *E. coli* (1.13 กรัมต่อลิตร) และยีน *ydcW* ที่ได้จากทั้ง *K. pneumoniae* (0.98 กรัมต่อลิตร) และ *E. coli* (0.94 กรัมต่อลิตร) ในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *K. pneumoniae* เมื่อหมักแบบ fed-batch ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเพิ่มขึ้นเป็น 24.4 กรัมต่อลิตร และผลิต 1,3-โพรเพนไดออล 49.3 กรัมต่อลิตร (Luo และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองผลกระทบของยีน *ald* จากเชื้อ *K. pneumoniae* เพื่ออธิบายลักษณะการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และการแสดงออกของยีน *ynel* และยีน *ydcW* พบว่ามีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ 2.4 กรัมต่อลิตรและ 1.8 กรัมต่อลิตรเมื่อยีน *ynel* และยีน *ydcW* ถูกแสดงออก ตามลำดับ ในขณะที่การผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 3.9 กรัมต่อลิตร และ 2.2 กรัมต่อลิตรภายใต้การหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สำหรับยีน *ald* อื่นๆ ที่แตกต่างกันได้แก่ยีน *aldH* จาก *E.coli* ยีน *puuC* จาก *K. pneumoniae* และยีน *kgsadh* จาก *Azospirillum brasilense* ได้ถูกนำมาศึกษา และใช้ *K. pneumoniae* เป็นโฮสต์ (Ko และคณะ, 2012) รวมทั้งได้นำยีน *dhaT* จากแบคทีเรียจำพวก *Enterobacteriaceae* และยีน *yghD* จาก *K. pneumoniae* ออกเพื่อลดการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการนำยีน *dhaT* ออกพบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ยีนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือยีน *kgsadh* โดยสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคในระหว่างการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์และการหมักแบบ fed-batch ได้เท่ากับ 5.77 กรัมต่อลิตร และ 16.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการใช้ยีน *puuC* ร่วมกับการนำยีน *dhaT* ออก พบว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยการหมักแบบ fed-batch ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพคือ 11.71 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักแบบ fed-batch ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำอยู่ที่ร้อยละ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการแสดงออกของทั้งยีน *puuC* และยีน *dhaB* สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้มากกว่า 28 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการใช้เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นโฮสต์สำหรับการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคมักมีผลิตภัณฑ์ร่วมคือ 1,3-โพรเพนไดออลเกิดขึ้นด้วย และความพยายามในการสร้างวิถีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคในเชื้อ *K. pneumoniae* ถูกสร้างโดย Zhu และคณะ (2009) จากการทดลองพบว่ายีน *aldA* มีกิจกรรมสูงต่อการผลิต 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนัลดีไฮด์ (3-HPA) และ NAD^+ มีผลต่อกิจกรรมมากกว่า $NADP^+$ จากที่มีรายงานพบว่า *dhaB* จะมีกิจกรรมที่สูงเมื่อทำงานภายใต้สภาวะไร้อากาศ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลกระทบของออกซิเจนต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดยทำการทดลองภายใต้ 3 สภาวะที่แตกต่างกันได้แก่ สภาวะให้ออกซิเจน สภาวะไร้ออกซิเจนและสภาวะให้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ผลการทดลองพบว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจะสูงที่สุดภายใต้สภาวะให้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอลโดยใช้ *dha* operon และใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นโฮสต์

Genes Transferred	Growth Conditions	3-HP Production (g/L)
aldA from *E. coli*	Aerobic batch	0.8
aldA from *E. coli*	Anaerobic batch	1.3
aldA from *E. coli*	Micro-aerobic batch	2.2
aldA from *E. coli*	Micro-aerobic two stage controlled ORP batch	2.8
Deletion of dhaD and overexpression of endogenous *aldHk*	Aerobic batch bioreactor	6.0
Deletion of dhaD and overexpression of endogenous *aldHk*	Aerobic fed-batch bioreactor	6.8
Overexpression of *PuuC* and *dhaT* deletion	Microaerobic flasks	3.65
Overexpression of *PuuC* and *dhaT* deletion	Microaerobic flasks	3.65
aldH from *E. coli*	Anaerobic flasks	1.13
aldH from *E. coli*	Anaerobic fed-batch bioreactor	24.4
Overexpression of *YneI*	Flasks	2.4
Overexpression of *YdcW*	Flasks	1.8
Overexpression of *YneI*	Batch bioreactor	3.9
Overexpression of *YdcW*	Batch bioreactor	2.2
kgsadh from *A. brasilense* and disruption of *dhaT*	Microaerobic flasks	5.77
kgsadh from *A. brasilense* and disruption of *dhaT*	Microaerobic fed-batch bioreactor	16.30
puuC from *K. pneumoniae* and disruption of *dhaT*	Microaerobic fed-batch bioreactor	11.71

ที่มา: Matsakas และคณะ (2014)

2.2.4 การใช้จุลินทรีย์อื่นๆ เป็นโฮสต์

จากที่มีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าจุลินทรีย์สองสายพันธุ์ถูกใช้มากที่สุดในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคคือ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* แต่ก็ยังมีการศึกษาใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ สำหรับการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพพิโอนิค *เช่น* การใช้ *Pseudomonas denitrificans* เป็นโฮสต์ในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค โดย *P. denitrificans* มีข้อได้เปรียบคือ สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่จำเป็นในการทำงานของยีน *dhaB* ได้ (Debussche และคณะ, 1992) การแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวในโฮสต์นี้เป็นแบบ heterologous expression (โฮสต์ที่ถูกตัดต่อยีน มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 1 รูปแบบ) มีการใช้ทั้งยีน *dhaB* และยีน *gdrAB* จาก *K. pneumoniae* และยีน *puuC* จาก *K. pneumoniae* (Zhou และคณะ, 2013) ดัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงในตารางที่ 2.4 มีเพียงยีน *dhaB* และ *gdrAB* เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพร-ไพโอนิคภายใต้สภาวะให้ออกซิเจน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเติม $CoCl_2$ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจะเพิ่มขึ้นเป็น 4.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งโคบอลต์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญและต้องการในปริมาณมากในการสังเคราะห์วิตามินบี12 โดยการเติมโคบอลต์คลอ-ไรด์ ($CoCl_2$) ทำให้การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Zhou และคณะ, 2013) และการแสดงออกของยีน *puuC* สามารถทำให้การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า *P. denitrificans* สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอ- นิคได้ดี แต่จุลินทรีย์นี้สามารถใช้กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย ส่งผลให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคลดต่ำลง นอกจากนี้ Ashok และคณะ (2011) ได้ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค พบว่าการกำจัดยีน 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (*3hibdhIV*) และยีน GMC-type oxidoreductase (*3hpdh*) ออกจะสามารถลดการย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้อย่างมีนัยสำคัญ และหากมีการแสดงออกของยีน *dhaB* ร่วมด้วย พบว่าการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเพิ่มขึ้นจาก 0.45 โมลต่อโมล (สายพันธุ์ปกติ) เป็น 0.78 โมลต่อโมล ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นสุดท้ายของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคที่ผลิตได้คือ 2.98 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอลโดยใช้ *dha* operon และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเป็นโฮสต์

Host	Genes Transferred	Growth Conditions	3-HP Production (g/L)
P. denitrificans	*dhaB* and *gdrAB* from *K. pneumonia*	Aerobic flasks	3.4
P. denitrificans	*dhaB* and *gdrAB* from *K. pneumonia*	Aerobic flasks with the presence of 25 mg/L $CoCl_2$	4.3
P. denitrificans	*dhaB*, *gdrAB* and *puuC* from *K. pneumonia*	Aerobic flasks with the presence of 25 mg/L $CoCl_2$	4.93
P. denitrificans	Overexpression of *dhaB* and deletion of *3hibdhIV* and *3hpdh*	Aerobic flasks	2.98

ที่มา: Matsakas และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรด

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสเฟต แร่ธาตุต่าง ๆ ปริมาณก๊าซออกซิเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งพีเอชและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอีกด้วย (Papagianni, 2004)

โดยในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์นั้นจำเป็นต้องเติมสารอาหารต่าง ๆ เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสเฟต ซัลเฟอร์ และแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น ลงไปให้เพียงพอ ซึ่งสารอาหารต่าง ๆ ที่เติมลงไปนอกจากจะช่วยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตดีแล้ว ยังช่วยในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอีกด้วย ตัวอย่างเช่นจุลินทรีย์บางชนิดต้องการเกลืออนินทรีย์ปริมาณเล็กน้อยเพื่อช่วยในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ดังนั้นปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นจึงขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของสับสเตรท สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง รวมทั้งกระบวนการหมักที่ใช้อีกด้วย (Zhang และคณะ, 2007)

พีเอชถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรด โดย Tay และ Yang (2002) พบว่า การผลิตกรด lactic acid และ fumaric acid จะลดลง เมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก พีเอช 6.0 เป็นพีเอช 4.0 นอกจากนี้ Miura และคณะ (2003) ยังพบอีกว่าการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณกรด lactic acid ปริมาณสูงสุด (93 กรัมต่อลิตร) จะต้องเพาะเลี้ยงที่พีเอชช่วง 6.0-6.5 ในขณะที่ Rosenberg และ Krištofiková (1995) กลับพบว่าการปรับพีเอชไม่มีผลต่อการผลิตกรด fumaric acid ดังนั้นผลของพีเอชจึงขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วย

Neutralizing agents ในการควบคุมพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักนั้น Neutralizing agents เช่น calcium carbonate, sodium carbonate และ sodium hydroxide มักจะถูกเติมลงไปในอาหารด้วย เพื่อใช้ควบคุมพีเอชในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่ในบรรดา Neutralizing agents ทั้งหมด calcium carbonate มักถูกใช้อย่างกว้างขวางทั้งในระดับ shake-flask และ bioreactor นอกจากนี้ sodium carbonate, sodium hydroxide และ ammonium hydroxide ก็มีรายงานว่าถูกใช้เพื่อเป็น neutralizing agents เช่นกัน (Zhang และคณะ, 2007)

การเติมก๊าซออกซิเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับจุลินทรีย์พวก aerobic-microorganisms นั้น การเติมก๊าซออกซิเจนที่เพียงพอจะจำเป็นมากต่อการเพาะเลี้ยงในถังหมัก เนื่องจากหากมีการให้อากาศที่ไม่เพียงพออาจทำให้จุลินทรีย์ตายลงได้ (Willke และ Vorlop, 2001) ดังนั้นปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่จะเติมลงไปจึงถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์โดยจุลินทรีย์พวก aerobic-microorganisms ในระดับ scaling-up reactor system และปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เติมมักจะคิดให้อยู่ในรูป volumetric oxygen transfer coefficient (kLa) แต่ในทางกลับกันสำหรับกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์พวก anaerobic microorganisms นั้น ออกซิเจนจะถือเป็นปัญหาสำคัญที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นจำเป็นต้องทำให้ถังหมักอยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มักถูกเติมลงไปเพื่อทำให้กระบวนการหมักอยู่ในสภาวะดังกล่าว ดังนั้นปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต้องเติมลงไปให้เพียงพอจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกระบวนการหมักกรดอินทรีย์โดยจุลินทรีย์พวก anaerobic microorganisms

อุณหภูมิก็ถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรด เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดนั้นการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (temperature sensitive) ซึ่งในสภาวะปรกติอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักจะอยู่ในช่วง 27-35 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (Zhang และคณะ, 2007)

2.4 การประยุกต์ใช้กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจัดเป็นสารที่มีความสำคัญลำดับต้นๆ ของสาร Buil-ding Blocks ทั้งหมด 12 ชนิด ที่สามารถผลิตได้จากการเปลี่ยนแปลงของชีวมวลโดยกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค สามารถใช้เป็นสารตัวกลางเพื่อการสังเคราะห์สารเคมีต่างๆ เช่น กรด acrylic, สาร 1,3-propanediol (1,3-PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-hydroxypropionic, กรด malonic, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคยังสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์ที่เคลือบด้วยโพลีเมอร์ ผลิตภัณฑ์หล่อลื่น และสารป้องกันไฟฟ้าสถิตสำหรับสิ่งทอ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต propiolactone, polyesters และ oligomers โดยอาศัยปฏิกิริยา cyclization และปฏิกิริยา polymerization โดยเฉพาะโพลีเมอร์ที่ผลิตได้จากการกลั่นตัวของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคที่เรียกว่า poly 3-hydroxypropionic acid สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับการผ่าตัดและยาซึ่งถือว่าเป็นวัสดุใหม่ที่เริ่มมีการพัฒนาขึ้นในวงการแพทย์ ซึ่งจุดเด่นของกรด poly 3-hydroxypropionic คือสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและเป็นโพลีเมอร์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้แทนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปิโตรเลียม (Jiang และคณะ, 2009)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Huang และคณะ (2013) รายงานการเพาะเลี้ยง *K. pneumoniae* แบบ fed-batch ที่มีการแสดงออกของยีน *aldH* จากเชื้อ *Escherichia coli* โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบให้อากาศเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

145940

และตรวจวัดการผลิตเมแทบอไรต์ต่างๆ ที่เกิดขึ้น พบว่าการเพิ่มอากาศให้มากขึ้นทำให้เซลล์เจริญเติบโต และสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ดียิ่งขึ้น ในขณะที่การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลลดลง ต่อมาได้มีการตัดต่อยีนสายพันธุ์ *K. pneumoniae*/pUC18*kan-ald*Hec มีผลทำให้ผลิต 3-ไฮดรอกซี-โพรไพโอนิคได้ 25.3 กรัมต่อลิตรและผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ 25.3 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ทั้งหมดคือ 0.66 โมลต่อโมล ในเวลา 28 ชั่วโมง ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอาหารต่อปริมาตรอากาศต่อนาที (vvm) อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศมากเกินไปจะไม่มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และ1,3-โพรเพนไดออล เนื่องจากการควบคุมของ *dha* operon โดยที่ปฏิกิริยาเร่งด้วยเอนไซม์กลีเซอรอล ดีไฮดราเตส (GDHt) และอัตราส่วนของ1,3-โพรเพนไดออลมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับอัตราการให้อากาศ ถึงแม้ว่าระดับการผลิตของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจะแสดงแนวโน้มเชิงบวกก็ตามซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณการผลิตของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และ1,3-โพรเพนไดออลสามารถควบคุมได้ด้วยอัตราการเติมอากาศ

Arasu และคณะ (2011) รายงานว่า *K. pneumoniae* สายพันธุ์ J2B (KpJ2B) คือจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลและกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอล อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการค้าเนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการการเจริญเติบโตต่ำ ดังนั้นในการแก้ปัญหาเหล่านี้ ทำโดยการทดลองเพาะเลี้ยงสายพันธุ์นี้ภายใต้สภาวะแบบให้อากาศโดยการเขย่า พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate หรือ μ) เท่ากับ 0.92 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *K. pneumoniae* DSMZ2026 (KpDSMZ) เมื่อนำสายพันธุ์ใหม่ไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ภายใต้สภาวะแบบให้อากาศโดยใช้วิธีการหมักแบบ fedbatch เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของชีวมวลเท่ากับ 4.03 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ CDW) และอัตราการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งคล้ายกับการเจริญของ KpDSMZ ที่สามารถพบการผลิต 1,3-โพร-เพนไดออล (186 มิลลิโมลาร์) กรดแลคติค (235 มิลลิโมลาร์) เอทานอล (170 มิลลิโมลาร์) กรดอะซิตริค (92.2 มิลลิโมลาร์) และ 2-keto-3-deoxyoctonate (KpJ2B, 1.4 ไมโครกรัมต่อกรัม CDW; KpDSMZ, 1.9 ไมโครกรัมต่อกรัม CDW) นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ J2B มีความไวสูงต่อยาปฏิชีวนะและมีคุณสมบัติการตกตะกอนดีกว่าสายพันธุ์ KpDSMZ จึงทำให้สายพันธุ์ J2B มีความน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Daniel และคณะ (1998) ได้พัฒนากระบวนการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคที่มีต้นทุนต่ำ โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกลีเซอรอลนั้นเป็แหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลและมีปริมาณมาก (Choi, 2008) แต่การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากกลีเซอรอล ยังคงอยู่ในระดับที่ต่ำคือ 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อ *E. coli* ที่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม โดยให้มีการแสดงออกของยีนกลีเซอรอล ดีไฮดราเทส (glycerol dehydratase) จากเชื้อ *K. pneumoniae* และยีน อัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) จากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (Suthers และ Cameron, 2001) นอกจากนี้ Raj และคณะ (2008) รายงานว่าเชื้อ *E. coli* BL21 ที่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม โดยให้มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์กลีเซอรอล ดีไฮดราเทส จากเชื้อ *K. pneumoniae* และเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*aldH*) จากเชื้อ *E. coli* พบว่าสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงถึง 0.58 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า นอกจากนี้ยังใช้เชื้อ *E. coli* SH-BGK1 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ชนิดอื่น คือ เอนไซม์ α-คีโตกลูตาริค เซมิอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส จากเชื้อ *Azospirillum brasilense* พบว่ามีผลผลิตมากขึ้นคือเท่ากับ 2.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการใช้เอนไซม์อัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนสที่พบในเชื้อ *E. coli* นอกจากนี้ในการใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศโดยหมักแบบ fedbatch ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่พีเอช 7.0 สายพันธุ์ SH-BGK1 สามารถผลิต กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ 38.7 กรัมต่อลิตร (Raj และคณะ, 2008; Rathnasingh และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตาม กระบวนการหมักนี้ยังจำเป็นต้องใส่โคเอนไซม์คือวิตามินบี 12 ซึ่งมีราคาที่แพง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสิ่งอื่นที่สามารถทดแทนกันได้และจะต้องมีราคาที่ถูกเพื่อลดต้นทุนในการผลิต เนื่องจากเชื้อที่นำมาตัดต่อทางพันธุกรรมยังไม่มีวิถีชีวเคมีที่ใช้สำหรับสังเคราะห์วิตามิน บี12 (Raj และคณะ, 2008; Rathnasingh และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง

3.1.1 กลีเซอรอล (Glycerol) Fisher chemical, ประเทศอังกฤษ

3.1.2 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) Merck, ประเทศเยอรมัน

3.1.4 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.5 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) Scharlau, ประเทศสเปน

3.1.6 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) Merck, ประเทศเยอรมัน

3.1.7 กรดซิตริก (Citric acid) AnalaR@, ประเทศอังกฤษ

3.1.8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) Merck, ประเทศเยอรมัน

3.1.9 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.10 โคบอลต์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.11 แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.12 กลูโคส (glucose) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.13 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH4)_2SO_4$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.14 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.15 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.16 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.17 เปปโตน (peptone) Srichem, ประเทศจีน

3.1.18 สารสกัดเนื้อ (meat extract) Biomark, ประเทศจีน

3.1.19 สารละลายแร่ธาตุ (trance element solution)

3.1.20 วุ้น (Agar)

3.1.21 ซีสเตอีน-ไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)

3.1.22 คาเซอิน เปปโตน (casein peptone)

3.1.23 TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8.0)

3.1.24 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

3.1.25 TE/Lysozyme (1:1)

3.1.26 Protease K 1mg/ml (เก็บที่ -20°C)

3.1.27 5M NaCl

3.1.28 CTAB/NaCl solution (0.7M NaCl, 10% (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide)

3.1.29 Chloroform/Isoamyl Alcohol (24:1) (CI)

3.1.30 Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25:24:1) (PCI)

3.1.31 Isopropanol

3.1.32 70% ethanol

3.1.33 RNase solution (disoluve in 10 mg RNase/ml in 10 mM /Tris HCl, 15 mM NaCl (pH 7.5))

3.1.34 Ethanol 99.5%

3.1.35 3M sodium acetate buffer (pH 5.0)

3.1.36 10X Standard Taq Reaction Buffer

3.1.37 10 mM dNTPs

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.38 10 µM Forward Primer ที่ใช้คือ 8F

3.1.39 10 µM Reverse Primer ที่ใช้คือ 1492R

3.1.40 Taq DNA Polymerase

3.1.41 Nuclease-Free Water

3.1.42 0.8% Agarose gel

3.1.43 สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ NEW BRUNSWICK รุ่น innova4230 ประเทศแคนาดา

3.2.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel Lab รุ่น 1375FX forced air oven ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLELabortechnikGmbH รุ่น Z326K ประเทศเยอรมัน

3.2.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Conthermรุ่น Polar 1000 ประเทศนิวซีแลนด์

3.2.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ lssco รุ่น BV T123 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85/110 ประเทศญี่ปุ่น

3.2.7 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG500 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น Sl-234 ประเทศเยอรมัน

3.2.9 เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1201V ประเทศญี่ปุ่น

3.2.10 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-20A ประเทศญี่ปุ่น

3.2.11 อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการด้านเทคโนโลยีชีวภาพและด้านจุลชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 แหล่งของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้คือแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เก็บรักษาบน glycerol agar slant

3.4 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

3.4.1 อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (M9 Broth) (Ko และคณะ, 2012) มีส่วนประกอบ ดังนี้

กลีเซอรอล (Glycerol)	9.2	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.25	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.0	กรัมต่อลิตร

3.4.2 อาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (M9 Agar) มีส่วนประกอบเดียวกับ M9 Broth แต่มีการเติม

วุ้น (Agar)	1.5-2.0	กรัมต่อลิตร

3.4.3 อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3- ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

3.4.3.1 Minimal medium – สูตรที่ 1 (Drożdżyńska และคณะ, 2014)

กลีเซอรอล (glycerol)	37.5	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	12.5	กรัมต่อลิตร
คาเซอิน เปปโตน (casein peptone)	2	กรัมต่อลิตร
โคบอลต์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.85×10^{-3}	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K2HPO4)	1.5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.2 Rich medium – สูตรที่ 2 (Saxena และคณะ, 2009)

กลีเซอรอล (Glycerol)	50	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	5	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.4	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
โคบอลต์(II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	4×10^{-3}	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	2.5	กรัมต่อลิตร
สารสกัดเนื้อ (meat extract)	1.5	กรัมต่อลิตร

3.4.3.3 Mineral medium – สูตรที่ 3 (Boenigk และคณะ, 1993)

กลีเซอรอล (Glycerol)	50	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	14	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	6	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)2SO_4$)	3	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.05	กรัมต่อลิตร
โคบอลต์(II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	11.9×10^{-3}	กรัมต่อลิตร
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมงกานีส(II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.01	กรัมต่อลิตร
ซีสเตอิน-ไฮโดรคลอริค (cystein-HCl)	0.2	กรัมต่อลิตร

3.4.3.4 Bioreactor medium – สูตรที่ 4 (Drożdżyńska และคณะ, 2014)

กลีเซอรอล (Glycerol)	50	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.4	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.6	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.4	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
โคบอลต์(II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	4×10^{-3}	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	2.5	กรัมต่อลิตร
สารสกัดเนื้อ (meat extract)	1.5	กรัมต่อลิตร

3.4.3.5 Culture medium – สูตรที่ 5 (Huang และคณะ, 2013)

กลีเซอรอล (Glycerol)	50	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัมต่อลิตร
กรดซิตริก (Citric acid)	0.42	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	1.6	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	5.4	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัมต่อลิตร
สารละลายแร่ธาตุ (trace element solution)	0.001	ลิตรต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	5	กรัมต่อลิตร
- แมงกานีส(II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	2	กรัมต่อลิตร
- ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.684	กรัมต่อลิตร
- โคบอลต์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.476	กรัมต่อลิตร
- คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.170	กรัมต่อลิตร
- กรดบอร์ลิก (H_3BO_3)	0.062	กรัมต่อลิตร
- โซเดียมโมลิเดรทไดไฮเดรท ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.005	กรัมต่อลิตร
- กรดไฮโรคลอริกเข้มข้น (HCl concentrated)	10	มิลลิลิตรต่อลิตร

3.5 การสกัด Genomic DNA จากแบคทีเรีย

ทำการสกัด Genomic DNA จากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ดังวิธีต่อไปนี้

3.5.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Rich medium ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และทำการเก็บเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 ชั่งน้ำหนักเซลล์ 0.15 กรัม และเติม TE/Lysozyme ปริมาตร 567 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.5.3 เติม SDS ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Protease K ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.5.4 เติม 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย

3.5.5 เติม CTAB ปริมาตร 80 ไมโครลิตร หรือสารละลาย NaCl และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.5.6 เติม CI ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายนาน 20-30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.5.8 ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์สีขาวตกลงไป

3.5.9 เติม PCI ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายนาน 20-30 วินาที

3.5.10 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.5.11 ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์สีขาวตกลงไป

3.5.12 ทำซ้ำข้อ 10-11 ประมาณ 2 ครั้ง

3.5.13 เติม Isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ทันทีจะเห็น Genomic DNA (เส้นสีขาว)

3.5.14 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3.5.15 เท Isopropanol ทิ้งและเติม ethanol ร้อยละ 70 โดยปริมาตร ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันเบา ๆ เพื่อให้ 16S DNA ตกตะกอน

3.5.16 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และใช้ปิเปตดูด ethanol ร้อยละ 70 โดยปริมาตร ออก

3.5.17 ทำ Genomic DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.5.18 ละลาย Genomic DNA ด้วย TE หรือน้ำปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.5.19 ตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ร้อยละ 0.8

3.5.20 เก็บรักษา Genomic DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 การเพิ่มปริมาณ 16S DNA โดยใช้เทคนิค PCR

3.6.1 เตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR ดังนี้

10X Standard Taq Reaction Buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 µM Forward Primer*	1	ไมโครลิตร
10 µM Reverse Primer**	1	ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
Template DNA	1	ไมโครลิตร
Nuclease-Free Water	40.75	ไมโครลิตร

หมายเหตุ *Forward Primer ที่ใช้คือ 8F (5'AGTTGATCCTGGCTCAG3')

**Reverse Primer ที่ใช้คือ 1492R (5'ACCTTGTTACGACTT3')

3.6.2 นำสารละลายในข้อ 3.10.1 เข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S DNA ที่สภาวะดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะขั้นตอนต่างๆ ในการใช้ตัวอย่างเข้าเครื่อง DNA thermal cycle

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	30 วินาที	1 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	30 รอบ
Annealing	50	30 วินาที	
Extension	68	1 นาที 30 วินาที	
Final extention	68	5 นาที	1 รอบ
Hold	12		

3.7 การทำ 16S DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick® PCR Purification Kit

3.7.1 เติม Buffer PB (5 M Gu-HCl ; 30% isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม 16S DNA ทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.7.2 ทำการย้ายเฉพาะคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม Buffer PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 80% ethanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.7.3 เท buffer PE ทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.4 ทำการย้ายเฉพาะคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม Buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) ปริมาตร 53 ไมโครลิตร โดยทำการหยด buffer ให้ลงไปตรงกลางของ membrane ที่มีลักษณะเป็นวงกลมสีขาว ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้ buffer ซึมผ่าน membrane และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

3.7.5 ทำการเก็บ DNA ที่บริสุทธิ์ปริมาตร 53 ไมโครลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต่อไป

3.8 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหารเหลว M9 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับปริมาณกล้าเชื้อให้เหมาะสม (โดยปรับให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/ml) นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ไปเติมลงในอาหารเหลว โดยใช้แบคทีเรียเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการตรวจสอบหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและตรวจสอบการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ซึ่งการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทำได้โดยการนำตัวอย่างมาทำ 10 fold dilution แล้วนำไป spread บนอาหารแข็งที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีเดี่ยวในช่วง 30-300 โคโลนี เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อต่อไป และการตรวจสอบการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองผ่านตัวกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

3.9.1 การเตรียมแบคทีเรียตั้งต้น

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว M9 (M9 borth) ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความขุ่นของเซลล์เทียบกับ Mcfarland standard no.5 ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อปรับให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/ml (McFarland, 1907)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.2 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.1 ในอาหาร 5 สูตร (3.4.3.1 , 3.4.3.2 , 3.4.3.3 , 3.4.3.4 และ 3.4.3.5) ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยอาหารแต่ละสูตรที่ทำการศึกษาคือ Minimal medium – สูตรที่ 1 (Drożdżyńska และคณะ, 2014) Rich medium – สูตรที่ 2 (Saxena และคณะ, 2009) Mineral medium – สูตรที่ 3 (Boenigk และคณะ, 1993) Bioreactor medium – สูตรที่ 4 (Drożdżyńska และคณะ, 2014) และ Culture medium – สูตรที่ 5 (Huang และคณะ, 2013) ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดด้วยสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นแยกส่วนใสด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และกรองส่วนใสที่ได้ด้วยแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสารเมทาบอไลต์ต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

3.9.3 การศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรด3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารตามข้อ 3.5:2 โดยเลือกสูตรอาหารที่มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสูงสุด จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ 0, 25, 50, 75 และ 150 รอบต่อนาที เพื่อหาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

3.9.4 การศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซี-โพรไพโอนิค

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารและความเร็วรอบที่มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอ-นิคสูงสุดตามข้อ 3.5.3 โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลงในอาหารดังกล่าว ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 0, 1, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก

3.10 การเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

ภายหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลายส่วนใส และนำสารละลายที่ได้นำมากรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน ส่วนที่กรองแล้วจะเก็บอยู่ในขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

vial เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ เช่น กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค กลีเซอรอล และ 1,3-โพรเพนไดออล เป็นต้น โดยใช้เครื่อง HPLC

3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสารเมทาบอไลต์ต่างๆ ในน้ำเลี้ยง

ปริมาณของสารต่างๆ ในน้ำเลี้ยงปริมาตร 20 ไมโครลิตรถูกตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC รุ่น LC-20A ของบริษัท Shimadzu โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H จากบริษัท BIO-RAD Laboratories ที่มีความยาว 300 × 7.8 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยปริมาณของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ถูกตรวจสอบโดยใช้ดีเทคเตอร์ชนิด UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร สำหรับปริมาณของ 1,3-โพรเพนไดออล และกลีเซอรอล ถูกตรวจสอบโดยใช้ดีเทคเตอร์ชนิด Refractive index (RI) (Huang และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

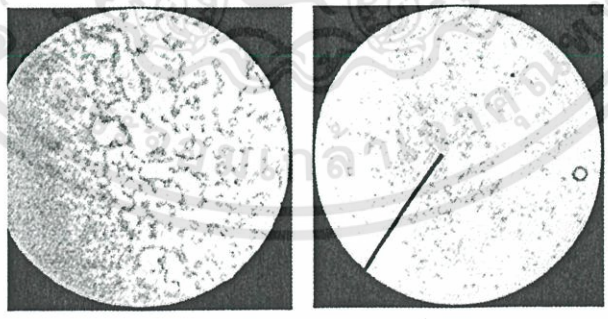
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคจากดิน โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ถึง 1.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าที่มีรายงานในปัจจุบันที่พบว่า *Lactobacillus* sp. (Luo และคณะ, 2011) และ *Lactobacillus reuteri* (Garai-Ibabe และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิด wild type สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้เพียง 0.1 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการตรวจวิเคราะห์ยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลและฐานข้อมูลทางชีวภาพ (Bioinformatics) และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ให้สูงขึ้นอย่างน้อยร้อยละ 25 ซึ่งผลการทดลองที่ได้อาจใช้เป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาและต่อยอดในผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อไป

4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานทั่วไปของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 โดยการตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ได้แก่ สี รูปร่าง ความนูน และขอบของโคโลนี นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่าง และวัดขนาดของจุลินทรีย์ ได้ผลดังรูปที่ 4.1



กำลังขยาย 400 เท่า กำลังขยาย 1,000 เท่า

รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม นูน ขอบหยัก ผิวหน้ามันวาว นอกจากนี้จากการย้อมแกรมพบว่าติดสีแดงของ Safanin จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีรูปร่างเป็นท่อนยาวอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ขนาดเซลล์เท่ากับ 1.5 ไมครอน

4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

จำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ 16S rRNA gene ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดย 16 rRNA จะถูกเพิ่มจานวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้ 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT) เป็น primers สำหรับการโคลนยีน 16S rRNA จะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM T-easy และ Transfrom เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังรูปที่ 4.2 ซึ่งจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 99

โดย *K. pneumoniae* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนและมีแคปซูล ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งแบบใช้และไม่ใช้อากาศ (Facultative anaerobic bacterium) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคได้ แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (Durgapal และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้ได้ถูกจัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Biosafety Level 2, BSL2) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Staphylococcus aurers* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้หากใช้การปฏิบัติตาม BSL 1 ร่วมกับการควบคุมการเข้าออกห้องปฏิบัติการ โดยบุคคลากรต้องใช้อุปกรณ์ความปลอดภัย เช่น ตู้ปลอดเชื้อ Class II (อากาศก่อนเข้าตู้จะกรองผ่าน HEPA filter แล้วลงสู่พื้นที่ปฏิบัติงานก่อนปล่อยออกนอกตู้) และหม้อนึ่งฆ่าเชื้อเป็นต้น (ศันสนีย์ ชีระพันธ์, 2555) นอกจากนี้จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *K. pneumonia* หลายสายพันธุ์ซึ่งรวมทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และสาร 1,3 โพรเพนไดออล ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพอลีเมอร์ และอื่นๆ เป็นต้น (Biebl และคณะ, 1999; Zeng และ Biebl, 2002) ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าสามารถที่จะทำงานวิจัยที่เกี่ยวกับ *K. pneumoniae* ได้ อีกทั้งทางห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องปฏิบัติการที่จัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Biosafety Level 2, BSL2) ซึ่งภายในห้องปฏิบัติการมีตู้ปลอดเชื้อ Class II (อากาศก่อนเข้าตู้จะกรองผ่าน HEPA filter แล้วลงสู่พื้นที่ปฏิบัติงานก่อนปล่อยออกนอกตู้) และมีสิ่งอำนวยความสะดวกและสาธารณูปโภคระดับ BSL1 ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้คือ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ PN1 มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อไป

```
   1 AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG ATTGAACGCT GGCGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC
  61 GGTAGCACAG AGAGCTTGCT CTCGGGTGAC GAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ATGTCTGGGA
 121 AACTGCCTGA TGGAGGGGGA TAACTACTGG AAACGGTAGC TAATACCGCA TAATGTCGCA
 181 AGACCAAAGT GGGGGACCTT CGGGCCTCAT GCCATCAGAT GTGCCCAGAT GGGATTAGCT
 241 AGTAGGTGGG GTAACGGCTC ACCTAGGCGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG AGGATGACCA
 301 GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAATATTG
 361 CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT
 421 AAAGCACTTT CAGCGGGGAG GAAGGCGGTG AGGTTAATAA CCTCATCGAT TGACGTTACC
 481 CGCAGAGGAA GCACCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGTGCAAGC
 541 GTTAATCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGCAGGCGGT CTGTCAAGTC GGATGTGAAA
 601 TCCCCGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTCG AAACTGGCAG GCTAGAGTCT TGTAGAGGGG
 661 GGTAGAATTC CAGGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATCT GGAGGAATAC CGGTGGCGAA
 721 GGCGGCCCCC TGGACAAAGA CTGACGCTCA GGTGCGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT
 781 AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGTCGATTTG GAGGTTGTGC CCTTGAGGCG
 841 TGGCTTCCGG AGCTAACGCG TTAAATCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTTAAAA
 901 CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA
 961 CGCGAAGAAC CTTACCTGGT CTTGACATCC ACAGAACTTT CCAGAGATGG ATTGGTGCCT
1021 TCGGGAACTG TGAGACAGGT GCTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTTGTG AAATGTTGGG
1081 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCTTATC CTTTGTTGCC AGCGGTTAGG CCGGGAACTC
1141 AAAGGAGACT GCCAGTGATA AACTGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAGT CATCATGGCC
1201 CTTACGACCA GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGCATATAC AAAGAGAAGC GACCTCGCGA
1261 GAGCAAGCGG ACCTCATAAA GTATGTCGTA GTCCGGATTG GAGTCTGCAA CTCGACTCCA
1321 TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGTAGATC AGAATGCTAC GGTGAATACG TTCCCGGGCC
1381 TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TGGGTTGCAA AAGAAGTAGG TAGCTTAACC
1441 TTCGGGAGGG CGCTTACCAC TTTGTGATTC ATGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAAC
1501 C
```

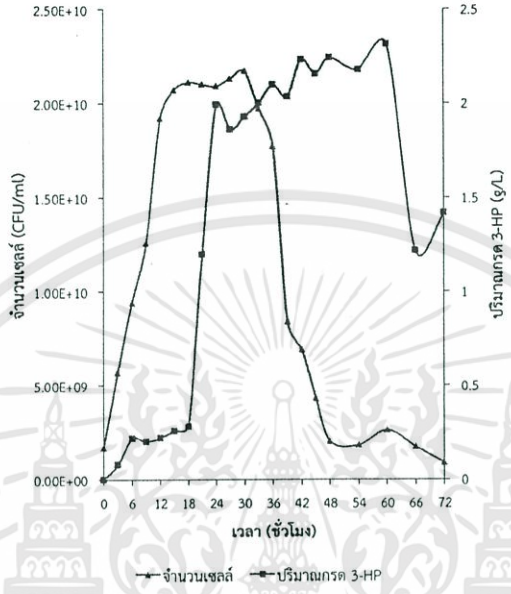
รูปที่ 4.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 โดยใช้ความขุ่นของแบคทีเรียเริ่มต้นที่ OD_{600nm} เท่ากับ 0.8 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 1.43×10^6 CFU/ml ปริมาณร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนครบ 72 ชั่วโมง และใช้วิธี Spread plate technique เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตและรายงานผลในหน่วย CFU/ml และตรวจสอบปริมาณของกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคที่ผลิตในเวลาต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC แสดงผลดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตและปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (กรด 3-HP) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.3 พบว่าการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ระยะ lag phase ค่อนข้างสั้นมากไม่สามารถตรวจพบได้ภายในระยะเวลาที่ทำการทดลอง log phase อยู่ในช่วงไม่เกิน 18 ชั่วโมง มีระยะ stationary phase ประมาณ 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะ death phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 สำหรับการตรวจวัดปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค พบว่ามีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคพร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสามารถตรวจพบได้ในช่วง stationary phase ซึ่งเท่ากับ 1.99 กรัมต่อลิตร (ที่เวลา 24 ชั่วโมง) นอกจากนี้แนวโน้มของปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคยังคงเพิ่มขึ้นแม้ภายหลังจากการเจริญในช่วง stationary phase ผ่านไปแล้ว โดยสามารถตรวจพบปริมาณกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุดเท่ากับ 2.31 กรัมต่อลิตร (ที่เวลา 60 ชั่วโมง) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียเจริญเข้าสู่ช่วง death phase แล้วและเซลล์ของแบคทีเรียอาจแตกหรือผนังเซลล์เกิดความเสียหายจึงทำให้กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคซึ่งถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ได้เพิ่มมากขึ้นนั่นเอง ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ไปทำการทดลองต่อไป

4.4 การศึกษาอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพร-ไพโอนิค

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหาร 5 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยอาหารที่ทำการศึกษาคือ อาหารสูตรที่ 1 Minimal medium (Drożdżyńska และคณะ, 2014) สูตรที่ 2 Rich medium (Saxena และคณะ, 2009) สูตรที่ 3 Mineral medium (Boenigk และคณะ, 1993) สูตรที่ 4 Bioreactor medium (Drożdżyńska และคณะ, 2014) และสูตรที่ 5 Culture medium (Huang และคณะ, 2013) โดยทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด และเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บ supernatant เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ เช่น กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค กลีเซอรอล และ1,3-โพรเพนไดออล เป็นต้น ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) นอกจากนี้ยังได้ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.4

จากตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.4 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหารเหลวทั้ง 5 สูตร ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีและสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ได้เท่ากับ 0.324, 6.403, 3.831, 3.954 และ 2.738 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง พบว่าสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้เท่ากับ 0.773, 3.004, 2.729, 3.744 และ1.252 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ยังสามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลร่วมได้อีกด้วย โดยเมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตได้เท่ากับ 0.737, 5.051, 8.738, 4.559 และ 7.732 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ได้เท่ากับ 1.241, 3.059 5.213, 2.322 และ 3.039 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 มีแนวโน้มในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2 โดยสามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 6.403 กรัมต่อลิตร (ค่าผลได้เท่ากับ 0.432 โมลกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อโมลกลีเซอรอล) และจากการศึกษายังพบว่าอาหารสูตร 1 ซึ่งมีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือกลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคส สามารถผลิตกรด 3-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

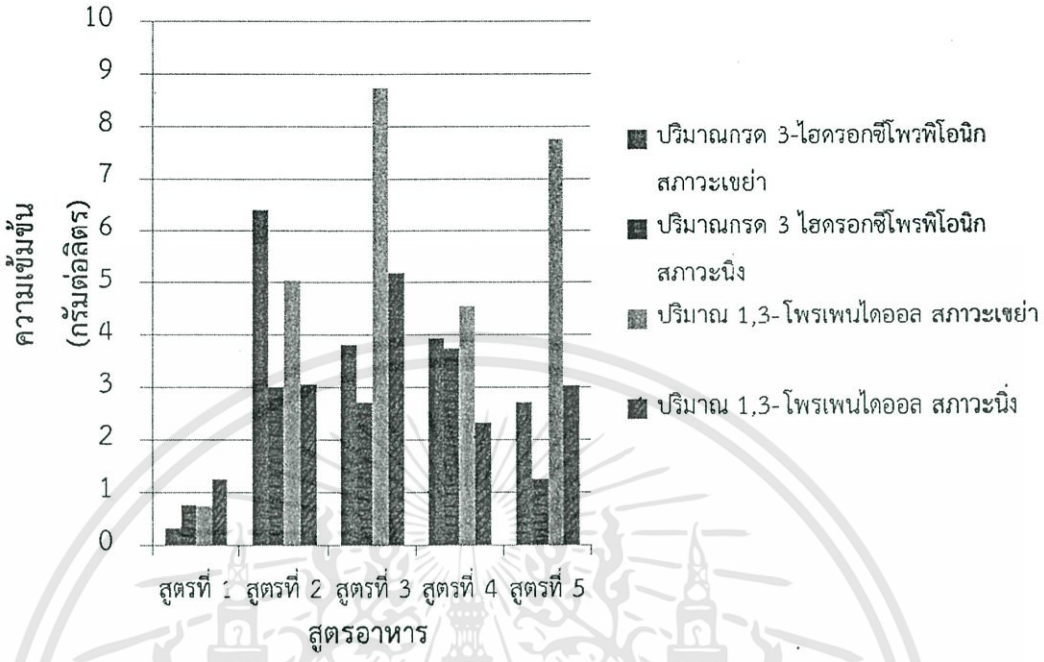
ไฮ-ดรอกซีโพรไพโอนิคได้ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในธรรมชาติจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้มักจะใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น และเมื่อพิจารณาสภาวะในการเพาะเลี้ยงพบว่าแนวโน้มในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ได้ในปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่า และการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ในปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (3-HP) และ 1,3-โพรเพนไดออล ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เลี้ยงในอาหาร 5 สูตรในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

condition	medium	$OD_{600\ nm}$	glycerol consumed (g/L)	3-HP (g/L)	Yield of 3-HP (mol/mol)	1,3-PDO (g/L)	Yield of 1,3-PDO (mol/mol)
Shaking	1	0.983	0.201	0.324	2.129	0.737	4.090
	2	1.322	17.999	6.403	0.432	5.051	0.288
	3	1.214	30.032	3.831	0.130	8.738	0.352
	4	1.379	19.602	3.954	0.206	4.559	0.281
	5	1.592	30.805	2.738	0.091	7.732	0.303
Static	1	0.654	2.894	0.773	0.279	1.241	0.526
	2	0.912	8.818	3.004	0.347	3.059	0.417
	3	0.975	17.999	2.729	0.155	5.213	0.351
	4	0.732	12.419	3.744	0.308	2.322	0.226
	5	0.999	15.38	1.252	0.083	3.039	0.240

หมายเหตุ:
- 1,3-PDO คือ 1,3-โพรเพนไดออล
- 3-HP คือ กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค
- กลีเซอรอลเริ่มต้นของสูตรที่ 1 เท่ากับ 46.5 กรัมต่อลิตร และกลีเซอรอลเริ่มต้นของสูตรที่ 2 3 4 และ 5 เท่ากับ 62.5 กรัมต่อลิตร
- ภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด

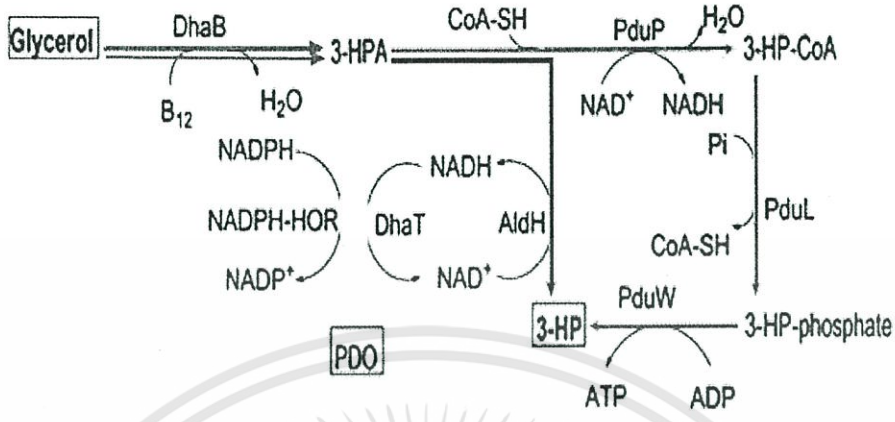
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และ 1,3-โพรเพนไดออลของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 5 สูตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 เพื่อผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงที่สุดคือ อาหารสูตร 2 (Rich medium) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหารสูตร 1 (Minimal medium) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนสองชนิด คือ กลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตทั้งกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้ต่ำที่สุด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Drożdżyńska และคณะ (2014) ที่รายงานว่าอาหารที่มีส่วนผสมระหว่างกลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคสนั้นไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล เนื่องจากในธรรมชาติจุลินทรีย์ซึ่งเป็น wild type มีความสามารถใช้เพียงแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลีเซอรอลเพียงชนิดเดียวเท่านั้นเพื่อผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยวิถีที่แบคทีเรียในธรรมชาติใช้ในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ได้แก่วิถี CoA-dependent ซึ่งวิถีนี้จะเริ่มต้นจากใช้กลีเซอรอลจนเปลี่ยนไปเป็นกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคด้วยขั้นตอนต่างๆ โดยมีเอนไซม์ โคเอนไซม์ โคแฟกเตอร์ และสารตัวกลางต่างๆ ดังรูปที่ 4.5 (Kumar และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสาร 1,3-โพรเพนไดออล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kumar และคณะ (2013)

นอกจากนี้ Drożdżyńska และคณะ (2014) ยังพบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิต 1,3- โพรเพนไดออล สูตรที่ 2 (Rich medium) เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล เพราะอาหารสูตร 2 (Rich medium) ประกอบไปด้วยเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และสารสกัดเนื้อซึ่งเป็นแหล่งของกรดอะมิโน ไนโตรเจน ฟอสเฟต แร่ธาตุและวิตามินต่างๆ โดยส่วนประกอบของอาหารสูตร 2 (Rich medium) ช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและในขณะเดียวกันก็จะช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตทั้งกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสาร 1,3-โพรเพน-ไดออลได้อีกด้วย และจากผลการศึกษาในครั้งนี้ก็ได้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Drożdżyńska และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหารสูตร 2 (Rich medium) จะสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสาร1,3-โพรเพนไดออลได้ในปริมาณสูงที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารสูตร 2 (Rich medium) และสูตร 4 (Bioreactor medium) ซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ เท่ากัน แต่กลับสามารถผลิตทั้งกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคและสาร 1,3-โพร-เพนไดออลได้ต่ำกว่าอาหารสูตร 2 (Rich medium) อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร 2 (Rich medium) มีสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้นสูงกว่าเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ในอาหารจึงทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมาได้สูงกว่าโดยที่พีเอชในอาหารไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค

ความเร็วรอบในการเขย่าสำหรับใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียนั้นมีผลอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เพราะแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตและจำเป็นต้องใช้อากาศในการหายใจระดับเซลล์เพื่อที่จะได้พลังงานไปใช้ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์และสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่างๆ สำหรับเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดย่อมมีความแตกต่างกันในแง่ของปริมาณการใช้อากาศ รวมไปถึงถ้าเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวแล้วจำเป็นต้องคำนึงถึงภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยเพราะจะส่งผลต่อปริมาณอากาศที่อยู่ในภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและรูปร่างของภาชนะเลี้ยงก็อาจส่งผลถึงการกระจายตัวของอากาศที่ใช้เลี้ยงด้วย

โดยปริมาณอากาศสำคัญและมีผลอย่างยิ่งในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค เพราะถ้ามีปริมาณอากาศในระบบมากเกินไปจะส่งผลกระทบให้การผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ลดน้อยลง เพราะปริมาณอากาศที่มากจะไปยับยั้งเอนไซม์ glycerol-dehydratase ไม่ให้ทำงาน ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ใช้ในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นสารตัวกลางสารแรกในกระบวนการสังเคราะห์กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ได้แก่ 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์ (3-HPA) และมีโคเอนไซม์คือวิตามินบี 12 แต่ในทางกลับกันถ้ามีปริมาณอากาศในระบบน้อยเกินไปจะทำให้การสร้างเซลล์ (biomass) ของแบคทีเรียลดลง ก็ส่งผลต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคให้น้อยลงเช่นกัน

จากการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค จึงได้คัดเลือกอาหารสูตรที่ 2 (Rich medium) (จากผลการทดลองที่ 4.4) และเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยง โดยเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดมาใช้ขวดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร และ ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตรแทน โดยทำการเขย่าด้วยความเร็วรอบที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 25, 50, 75 และ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (3-HP) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 (Rich medium) และเขย่าด้วยความเร็วรอบที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

RPM	container	$OD_{600\ nm}$	glycerol consume (g/L)	pH	3-HP (g/L)	Yield of 3-HP (mol/mol)
0	Flask	0.583	0.460	6.89	0.158	0.000
	Vial	0.407	5.350	6.91	0.176	0.034
25	Flask	1.536	4.992	6.73	0.168	0.034
	Vial	0.428	4.721	6.86	0.162	0.035
50	Flask	0.363	0.633	6.93	0.152	0.246
	Vial	0.194	4.051	7.07	0.145	0.037
75	Flask	1.403	4.319	6.76	0.148	0.035
	Vial	0.193	3.791	6.93	6.268	1.689
150	Flask	1.456	3.433	6.82	0.227	0.068
	Vial	0.175	3.750	6.91	0.162	0.044

จากตารางที่ 4.2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหารสูตรที่ 2 (Rich medium) ด้วยความเร็วรอบที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าที่เขย่าด้วยความเร็วรอบ 0, 25, 50, 75 และ 150 รอบต่อนาที ในภาชนะที่เป็นฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ได้เท่ากับ 0.158, 0.168, 0.152, 0.148 และ 0.227 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และภาชนะที่เป็นไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้เท่ากับ 0.176, 0.162, 0.145, 6.268 และ 0.162 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในภาชนะไวออลที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที โดยสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุดคือ 6.268 กรัมต่อลิตร (ค่าผลได้เท่ากับ 1.689 โมลกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอ-นิคต่อโมลกลีเซอรอล) และสังเกตได้ว่าที่สภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 0, 25, 50 และ 150 รอบต่อนาที มีการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ต่ำมาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที ในภาชนะที่เป็นไวออลจะทำให้แน้วโน้มในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซี-โพรไพโอนิคของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ได้ในปริมาณสูง และในการทดลองนี้ทำให้เห็นว่าไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในภาชนะประเภทใดในสภาวะนิ่งก็ทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิต กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ต่ำมาก

จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 0 ซึ่งเป็นสภาวะนิ่ง และความเร็วรอบ 25 และ 50 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นความเร็วรอบต่ำ ดังนั้นอาจทำให้อากาศไม่สามารถกระจายเข้าไปได้ดี จึงส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ ในขณะที่การเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แบคทีเรียอาจได้รับอากาศในปริมาณที่สูง ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อใช้ภาชนะที่เป็นฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตรในการพาะเลี้ยง โดยภาชนะชนิดนี้มีพื้นที่ในการละลายของอากาศลงไปในอาหาร (dissolve oxygen) ได้มาก เมื่อได้รับออกซิเจนในปริมาณมากจึงส่งผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ Glycerol-dehydratase (GDHt) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 3-ไฮดรอกซีโพร-ไพโอนอลดีไฮด์ (3-HPA) จึงทำให้ที่สภาวะการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ลดลง (Kumar และคณะ, 2013) ในขณะที่ภาชนะชนิดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร มีพื้นที่ในการละลายของอากาศน้อยกว่าฟลาสก์จึงทำให้เมื่อเพาะเลี้ยงในภาชนะไวออลจึงมีการผลิตกรด 3- ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในภาชนะที่เป็นฟลาสก์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Huang และคณะ (2013) พบว่าถ้าเพิ่มอากาศเข้าไปในระบบที่เป็น Anaerobic 0.1 ปริมาณอากาศต่อปริมาณอาหารเหลวต่อนาที (vvm) และระบบ Microaerobic (เติมออกซิเจนเล็กน้อย) 0.1, 0.4, 0.6, 1.0 และ 1.5 ปริมาณอากาศต่ออาหารต่อนาที จะทำให้สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซี-โพรไพโอนิคได้เท่ากับ 16.6, 16.8, 21.7, 25.8, 38.5 และ 48.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในระบบ Aerobic ที่เติมออกซิเจนให้ละลายอยู่ในอาหาร (DO) ร้อยละ 5 นั้น พบว่าไม่สามารถตรวจพบการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้เลย

4.6 การศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพ-โอนิค

เนื่องจากกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคมีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นเดียวกับกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพราะว่าสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดจะไปทำลายส่วนต่างๆของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) รวมไปถึงเอนไซม์ต่างๆ ดังนั้นจำเป็นต้องมีสารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์เพื่อช่วยรักษาสภาพในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้มีความเป็นกลาง (neutralize) เพื่อเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคให้สูงขึ้น และสารที่ถูกใช้เพื่อทำหน้าที่ดังกล่าว ได้แก่แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

จากผลการศึกษาชนิดของอาหารและความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพร-ไพโอนิคแล้ว จึงได้เลือกชนิดของอาหารและความเร็วรอบที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 แล้วสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้ในปริมาณที่สูง ได้แก่การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2 (Rich medium) ในภาชนะชนิดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 75 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ ร้อยละ 0, 1, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และตรวจความสามารถในการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค (3-HP) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2 (Rich medium) ในขวดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เติมปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) แตกต่างกัน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

%$CaCO_3$ (w/v)	OD $_{600\ nm}$	Glycerol consumed (g/L)	pH	3-HP (g/L)	Yield of 3-HP (mol/mol)
0	0.879	8.235	6.33	3.455	0.429
1	0.564	8.953	6.90	4.774	0.545
5	0.492	7.465	7.12	3.064	0.420
10	0.295	6.602	7.89	2.364	0.366
15	0.247	6.032	8.13	2.152	0.365

จากตารางที่ 4.3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ในอาหารสูตรที่ 2 (Rich medium) ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลงไปในปริมาณร้อยละ 0, 1, 5, 10 และ15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค ได้เท่ากับ 3.455, 4.774, 3.064, 2.364 และ 2.152 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 (Rich medium) และมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสูงที่สุดเท่ากับ 4.774 กรัมต่อลิตร (ค่าผลได้เท่ากับ 0.545 โมลกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อโมลกลีเซอรอล) ซึ่งแนวโน้มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคของแบคทีเรียสายพันธ์ PN1 สูงที่สุดคือปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

Ashok และคณะ (2011) และ Rathnasingh และคณะ (2009) รายงานว่ากรด 3-ไฮดรอกซี-โพรไพโอนิคมีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นเดียวกับกรดชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในช่วงระยะปลายของการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ผสมระหว่างเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ซึ่งมีอัตราการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคสูงถึง 200–300 mM แต่ในช่วงระยะปลายของการเจริญเติบโตอัตราการผลิตกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อมีการเติมกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคลงในอาหารอย่างต่อเนื่อง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์รวมถึงการใช้กลีเซอรอลและการผลิตกรด 3-ไฮ- ดรอกซีโพรไพโอนิคนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน (Kumar และคณะ, 2012) ดังนั้นเพื่อเป็นรักษาให้อาหารมีสภาพเป็นกลางมากขึ้นจึงต้องเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปเพื่อไปลดความเป็นพิษที่เกิดจากความเป็นกรดในอาหารมีมากเกินไปนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN 1 โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PN 1 กับแบคทีเรียชนิดอื่นโดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN 1 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 99

5.1.2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN 1 ในอาหาร 5 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 Minimal medium (Drożdżyńska และคณะ, 2014) สูตรที่ 2 Rich medium (Saxena และคณะ, 2009) สูตรที่ 3 Mineral medium (Boenigk และคณะ, 1993) สูตรที่ 4 Bioreactor medium (Drożdżyńska และคณะ, 2014) และสูตรที่ 5 Culture medium (Huang และคณะ, 2013) ในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ในสภาวะเขย่า โดยสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุดคือ 6.403 กรัมต่อลิตร (ค่าผลได้เท่ากับ 0.432 โมลกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อโมลกลีเซอรอล)

5.1.3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN 1 ในอาหารสูตรที่ 2 Rich medium ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 0, 25, 50, 75 และ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมงและใช้ภาชนะในการเพาะเลี้ยง 2 แบบ ได้แก่ ขวดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร และ ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในขวดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที โดยสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุดคือ 6.268 กรัมต่อลิตร (ค่าผลได้เท่ากับ 1.689 โมลกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อโมลกลีเซอรอล)

5.1.4 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PN 1 ในอาหารสูตรที่ 2 Rich medium ในขวดไวออลขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เติมปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0, 1, 5, 10 และ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PN1 สามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 1 โดยสามารถผลิตกรด 3-ไฮดรอก-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซีโพรไพโอนิคได้สูงสุดคือ 4.774 กรัมต่อลิตร (ค่าผลได้เท่ากับ 0.545 โมลกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิคต่อโมลกลีเซอรอล)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาการรักษาสภาพความเป็นกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยบัฟเฟอร์ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม

5.2.2 ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการผลิตกรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค เช่น ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น และปริมาณวิตามินบี 12 เป็นต้น

5.2.3 ควรมีการศึกษาการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด

- นำเสนอผลงานโดยโปสเตอร์ระดับนานาชาติ ในงานประชุม "The 13th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology" ภายใต้หัวข้อ "Enhanced 3-hydroxypropionic acid production in newly isolated PN1 using medium and condition optimization" ระหว่างวันที่ 6-8 ธันวาคม 2558 ณ เมืองเซินเจิ้น ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ศันสนีย์ ชีระพันธ์. ความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 2555;60:15-18.

Arasu MV, Kumar V, Ashok S, Song H, Rathnasingh C, Lee HJ, Seung D, Park S. "Isolation and characterization of the new *Klebsiella pneumonia* J2B strain showing improved growth characteristics with reduced lipopolysaccharide formation. Biotechnol Bioprocess Eng 2011;16:1134-1143.

Ashok S, Raj SM, Rathnasingh C, Park S. Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ*dhaT* strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3 propanediol from glycerol. Appl Microbiol Biotechnol 2011;90:1253-1265.

Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. Microbial production of 1,3-propanediol. Appl Microbiol Biotechnol 1999;52:289-297.

Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. Appl Microbiol Biot 1993;38:453-457.

Choi WJ. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. Recent Pat Biotechnol 2008;2:173-180.

Daniel R, Bobik TA,,Gottschalk G. Biochemistry of coenzyme B12-dependent glyceroland diol dehydratases and organization of the encoding genes. FEMS Microbiol Rev 1998;22:553-566.

Debussche L, Couder M, Thibaut D, Cameron B, Crouzet J, Blanche F. Assay, purification, and characterization of cobaltochelatase, a unique complex enzyme catalyzing cobalt insertion in hydrogenobyrinic acid *a,c*-diamide during coenzyme B_{12} biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans*. J Bacteriol 1992;174:7445-7451.

Drożdżyńska A, Pawlicka J, Kubiak P, Košmider A, Pranke D, Olejnik-Schmidt A, Czaczyk K. Conversion of glycerol to ,3-propanediolby *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*-newly isolated strains from the Enterobacteriaceae.. N Biotechnol 2014;31:402-410.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi A, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Irastorza A, Dueñas MT. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. Int J Food Microbiol 2008;121:253-261.

Ho KK, Weiner H. Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the *aldB* gene of *Escherichia coli*. J Bacteriol 2005;187: 1067-1073.

Huang Y, Li Z, Shimizu K, Ye Q. Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Bioresour Technol 2012;103:351-359.

Huang Y, Li Z, Shimizu K, Ye Q. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by *Klebseilla pneumoniae* expressing aldH under microaerobic conditions. Bioresour Technol 2013;128:505-512.

Jiang X, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. Appl Microbiol Biotechnol 2009;82:995-1003.

Jo JE, Raj SM, Rathnasingh C, Selvakumar E, Jung WC, Park S. Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. Appl Microbiol Biotechnol 2008;81:51-60.

Ko Y, Ashok S, Zhou S, Kumar V, Park S. Aldehyde dehydrogenase activity is important to the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Klebsiella pneumoniae*. Process Biochem 2012;47:1135-1143.

Krauter H, Willke T, VorlopK-D. Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity. N Biotechnol 2012;29(2):211-217.

Kumar V, Mugesh S, Jae K, Durgapal M, Ashok S, Ko Y, Sarkar R, Park S. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol using resting cells of *Klebsiella pneumoniae* J2B strain with overexpression of KGSADH. Appl Microbiol Biotechnol 2012;96:373-383.

Kumar V, Ashok S, Park Sunghoon. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. Biotechnol Adv 2013;31:945-961.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Leal NA, Havemann GD, Bobik TA. PduP is a coenzyme-A-acylating propionaldehyde dehydrogenase associated with the polyhedral bodies involved in B12-dependent 1, 2-propanediol degradation by a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT12. Arch Microbiol 2003;180:353-361.

Liu YN, Leal A, Sampson EM, Johnson CL, Havemann GD, Bobik TA. PduL is an evolutionarily distinct phosphotransacylase involved in B12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. J Bacteriol 2007;189:1589-1596.

Luo LH, Seo JW, Baek JO, Oh BR, Heo SY, Hong WK, Kim DH, Kim CH. Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. Appl Microbiol Biotechnol 2011;89:697-703.

Luo LH, Kim CH, Heo SY, Oh BR, Hong WK, Kim S, Kim DH, Seo JW. Production of 3-hydroxypropionic acid through propionaldehyde dehydrogenase PduP mediated biosynthetic pathway in *Klebsiella pneumoniae*. Bioresour Technol 2012;103:1-6.

Luo LH, Seo JW, Heo SY, Oh BR, Kim DH, Kim CH. Identification and characterization of *Klebsiella pneumoniae* aldehyde dehydrogenases increasing production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. Bioprocess Biosyst Eng 2013;36:1319-1326.

Matsakas L, Topakas E, Christakopoulos P. New trends in microbial production of 3-hydroxypropionic acid. Curr Biochem Eng 2014;1:1-14.

McFarland J. The nephelometer: An estimating the number of bacteria in suspensions for calculating the opsonic index and vaccines. JAMA 1907;49:1176.

Miura S, Arimura T, Hoshino M, Kojima M, Dwiarti L, Okabe M. Optimizaiton and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. J Biosci Bioeng 2003;96:65-69.

Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Biotechnol Adv 2004;22:189-259.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pina CD, Falletta E, Rossi M. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. Green Chem 2011;13:1624-1632.

Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. Process Biochem 2008;43: 1440-1446.

Raj SM, Rathnasingh C, Jung WC, Park SH. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 2009;84:649-657.

Raj SM, Rathnasingh C, Jung WC, Selvakumar E, Park S. A Novel NAD^+-dependent aldehyde dehydrogenase encoded by the *puuC* gene of *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 that utilizes 3-Hydroxypropionaldehyde as a substrate. Biotechnol Bioprocess Eng 2010;15:131-138.

Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, Park SH. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. Biotechnol Bioeng 2009;104:729-739.

Rosenberg M, Krištofíková L. Physiological restriction of the L-lactic acid production by *Rhizopus arrhizus*. Acta Biotechnol 1995;15:367-374.

Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J. Microbial production of 1,3-propanediol: recent development and emerging opportunities. Biotechnol Adv 2009;27:895-913.

Sobolov M, Smiley FA. Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. J Bacteriol 1960;79:261-266.

Suthers, PF. and Cameron, DC. Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms. Patent Applied no. PCT WO 01-16346, 2001.

Talarico TD, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob Agents Chemother 1988;32:1854-1858.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tay A, Yang ST. Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. Biotechnol Bioeng 2002;80:1-12.

Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass, vol 1: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. US Department of Energy; 2004 [http://www.osti.gov/bridge].

Willke T, Vorlop KD. Biotechnological production of itaconic acid. Appl Microbiol Biotechnol 2001;56:289-295.

Xue J, Murrieta CM, Rule DC, Miller WK. Exogenous or L-rhamnose-derived 1,2-propanediol is metabolized via a pduD-dependent pathway in *Listeria innocua*. Appl Environ Microbiol 2008;74:7073-7079.

Yasuda S, Mukoyama M, Horikawa H, Toraya T, Morita H. Process for producting 1,3-propanediol and or/3-hydroxypropionic acid. US Patent 2007,0,148,749,2007.

Zeng AP, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. Adv Biochem Eng Biotechnol 2002;74:239-259.

Zhang ZY. et al. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. Biochem Engineer J 2007;35;251-263.

Zhou S, Catherine C, Rathnasingh C, Somasundar A, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Pseudomonas denitrificans*. Biotechnol Bioeng 2013;110:3177-3187.

Zhu B, Li J, He Y, Yamane H, Kimura Y, Nishida H, Inoue Y. Effect of steric hindrance on hydrogen-bonding interaction between polyesters and natural polyphenol catechin. J Appl Polym Sci 2004;91:3565-3573.

Zhu J-G, Ji X-J, Huang H, Du J, Li S, Ding Y-Y. Production of 3-hydroxypropionic acid by recombinant *Klebsiella pneumoniae* based on aeration and ORP controlled strategy. Kor J Chem Eng 2009;26:1679-1685.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

หลักฐานเอกสารอ้างอิงสำหรับรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด

哈爾濱工業大學

HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY

The 13th international symposium on biocontrol and biotechnology

Date of conference: November 6-8, 2015

Tittle: Enhanced 3-hydroxypropionic acid production in newly isolated PN1 using medium and condition optimization

Dear Dr.Somphit Sornyotha:

I acknowledge the receipt of your abstract which is receiving attention for presentation.

Sincerely yours

Prof. Dr. Yang Qian

School of Life Science and Technology,

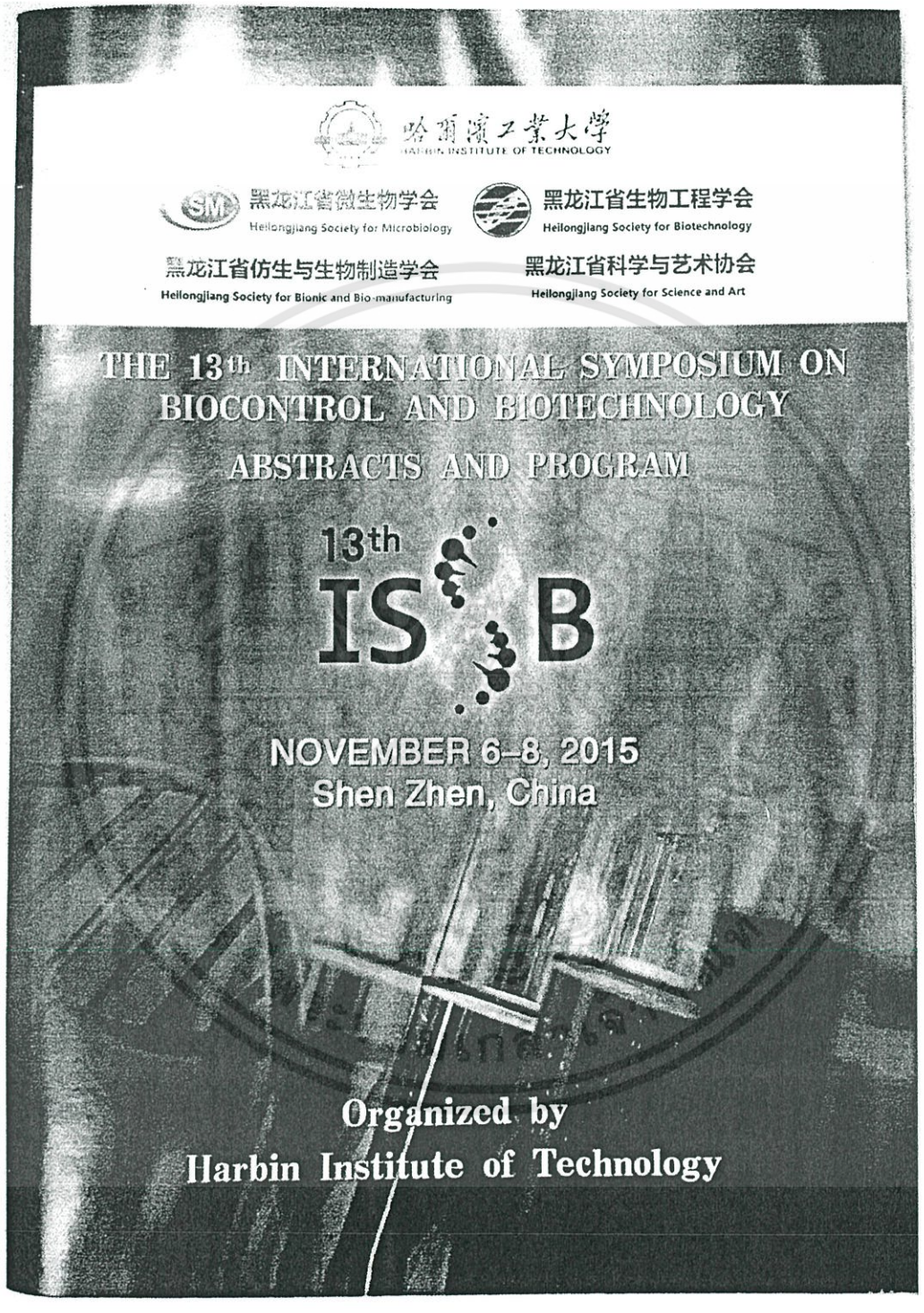
Harbin Institute of Technology

The Chairman of the Heilongjiang Province Society of Microbiology

The Chairman for the Academic Organizing Committee of the Symposium

Tel No.:13804501685

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enhanced 3-Hydroxypropionic Acid Production in Newly Isolated PN1 using Medium and Condition Optimization

Somphit SORNYOTHA§*, Chakrit TACHAAPAIKOON†, Patthra PASON†, Khanok RATANAKHANOKCHAI‡

§ Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand, Email: kssomphi@staff.kmitl.ac.th

† Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150, Thailand

‡ Enzyme Technology Laboratory, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150, Thailand

Abstract

The objective of this study was to study the optimization of 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by a newly isolate PN1. The effects of different parameters such as culture mediums, shaker agitation rate (rpm) and concentration of calcium carbonate on 3-hydroxypropionic acid production were examined. The result showed that a newly isolate PN1 had a tendency to produce 3-hydroxypropionic acid at high concentration when grown in rich medium containing glycerol as a carbon source incubated in a rotary shaker at 75 rpm in the presence of 1% (w/v) calcium carbonate, the 3-hydroxypropionic acid production was enhanced by approximately 234%, compared to the control conditions. In addition, the morphology and 16S rRNA gene analysis were also studied and it was Gram negative, rod-shaped and identified as Klebsiella pneumonia.

Keywords: Glycerol, 3-Hydroxypropionic acid, Optimization, The isolate PN1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enhanced 3-Hydroxypropionic Acid Production in Newly Isolated PN1 using Medium and Condition Optimization

Somphit Sornyotha[§,*], Chakrit Tachaapaikoon[†], Patthra Pason[†], and Khanok Ratanakhanokchai[‡]

[§] Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand, Email: kssomphi@staff.kmitl.ac.th

[†] Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150, Thailand

[‡] Enzyme Technology Laboratory, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150, Thailand

The objective of this study was to study the optimization of 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by a newly isolate PN1. The effects of different parameters such as culture mediums, shaker agitation rate (rpm) and concentration of calcium carbonate on 3-hydroxypropionic acid production were examined. The result showed that a newly isolate PN1 had a tendency to produce 3-hydroxypropionic acid at high concentration when grown in rich medium containing glycerol as a carbon source incubated in a rotary shaker at 75 rpm in the presence of 1% (w/v) calcium carbonate, the 3-hydroxypropionic acid production was enhanced by approximately 234%, compared to the control conditions. In addition, the morphology and 16S rRNA gene analysis were also studied and it was Gram negative, rod-shaped and identified as *Klebsiella pneumonia*.

What is 3-hydroxypropionic acid ?

3-Hydroxypropionic acid (3-HP) is a value-added chemical, which is ranked at the top third among twelve platform chemicals selected by the US Department of Energy (DOE), that can be produced from renewable glycerol by microbial bioconversion. 3-HP can be used to produce a wide range of chemical derivatives such as 1,3-propanediol (1,3-PDO), acrylic acid, acrylamide, malonic acid and poly(3-hydroxypropionate) (Kumar et al., 2013: Valdehuesa et al., 2013).

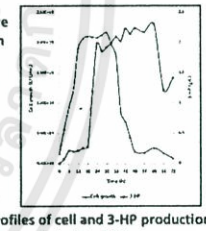
Who are producers?

Many microorganisms can produce 3-HP as either an intermediate or end product through a range of metabolic pathways. The natural producers include both prokaryotes and eukaryotes. (Kumar et al., 2013: Valdehuesa et al., 2013). Among these microbes, *K. pneumoniae*, has been studied most intensively for the production of 3-HP from glycerol. It is a Gram-negative, facultative anaerobic, rod shaped bacterium that belongs to the family *Enterobacteriaceae* and is found mostly in the soil, normal flora of the mouth, skin, intestines of humans and mammals (Arasu et al., 2011).

How to screen potential candidates?

- Natural sources were added into medium containing 2% (w/v) glycerol as a carbon source.
- When turbidity was observed in the test tubes, the culture broth was streaked on agar medium contalning 0.5% (w/v) $CaCO_3$.

- Colonies dissolving $CaCo_3$ were isolated and studied for 3-HP production.
- One of them was selected because it gave the highest 3-HP production, it was Gram negative, rod-shaped and identified as *Klebsiella pneumoniae*, and named PN1.



- Profiles of cell and 3-HP productions of a newly isolate PN1.

Optimization of 3-HP Production by a newly isolate PN1

- **Culture mediums: Minimal medium, Rich medium, Mineral medium, Bioreactor medium and Mineral medium (Control) (Drożdżyńska et al., 2014)**

  Of all the tested media, Rich medium was the best medium for the production of 3-HP. It was a rich medium contalning bactopepton, yeast and meat extracts which were source of amino acids, nitrogen, phosphate, minerals and vitamins.

- **Shaker agitation rate (rpm): 0, 25, 50, 75 and 150 (control)**

  The efforts aiming at improving 3-HP production based on the aldehyde dehydrogenase (AldA) activity manipulation had been studied, and the result found that the AldA activity was the highest in aerobic culture, followed by microaerobic culture, and the lowest in anaerobic culture (Zhu et al., 2009).

- **Concentration of calcium carbonate: 0 (control), 1, 5 and 10% (w/v)**

  As with other acids, 3-HP was also toxic to cell growth and its production. In general, the toxic effects of organic acids were related to their ability to diffuse across the cell membrane. The export of organic acids requires high energy, particularly at low extracellular pH (Kumar et al., 2013). Then, to control the growth pH during the fermentation, neutralizing agents such as calcium carbonate, sodium carbonate and sodium hydroxide need to be added into fermentation medium. Among these agents, calcium carbonate has been widely used in the shake flask investigations and bioreactor processes.

✡ ✡ **With all the optimized conditions (Rich medium, 75 rpm and 1% (w/v) calcium carbonate), the highest concentration of 3-HP achieved was 6.4 ± 0.8 g/L.**

✡ Acknowledgements ✡

This study was supported financially by the Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน	
1. งบดำเนินงาน (ค่าใช้สอย ค่าวัสดุ)		
1.1 ค่าใช้สอย		
1) ค่าจ้างเหมาบริการ เช่น ค่าจ้างเหมาบริการวิเคราะห์กรด 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิค และสารเมตาบอไลท์ ต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC ค่าจ้างเหมาบริการในการเตรียมตัวอย่าง 16S rRNA gene เป็นต้น	7,500.00	
2) ค่าจ้างวิเคราะห์ เช่น ค่าจ้างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย เป็นต้น	7,500.00	
รวม		15,000.00
1.2 ค่าวัสดุ		
1) ค่าวัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ A4, แฟ้มเก็บเอกสาร เป็นต้น	2,000.00	
2) ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์ เช่น หมึกพิมพ์, แผ่น CD เป็นต้น	3,000.00	
3) ค่าถ่ายเอกสาร	3,000.00	
4) ค่าวัสดุการศึกษา เช่น ค่า pipet tips, ค่าเพลทแก้ว, ค่าหลอดฝาเกลียว, ค่า centrifuge tube ขนาด 1.75 ml, ค่า syringe filter membrane, 0.22 μm, ค่า syringe plastic และค่าสารเคมี เช่น $ZnCl_2$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1,3-propanediol และ 3-hydroxypropionic acid เป็นต้น	27,000.00	
รวม		35,000.00
รวมงบดำเนินงาน (ค่าใช้สอย+ค่าวัสดุ)		**50,000.00**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

ประวัติส่วนตัว

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ ดร.

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
B.Sc.	Major of Biotechnology	Silpakorn University	2000
M.Sc.	Biochemical Technology	King Mongkut's University of Technology Thonburi	2003
Ph.D.	Biochemical Technology	King Mongkut's University of Technology Thonburi	2008

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ: Enzyme and Protein Technology, Molecular biology, Microbiology และ Bioconversion

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี ค.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2001 - 2003	ทุนการศึกษา	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTECH) Grant
2003-2006	ทุนการศึกษา	Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of the Thailand Research Fund
2010	ทุนวิจัย	Exchange Program for East Asian Young Researchers under Japan Society for the Promotion of Science (JSPS)
2012	ทุนวิจัย	International Center for Environmental Technology Transfer (ICETT), Japan
2013-2015	ทุนวิจัย	the Thailand Research Fund (TRF Grant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

(1) **Sornyotha, S.,** Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2007, "Purification and detection of linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography", Food Chemistry, Vol.104, pp.1750-1754.

(2) **Sornyotha, S.,** Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2008, "Extraction, purification and characterization of linamarase from cassava root parenchyma of the high-cyanogen cultivar KU-50", KMUTT Research and Development Journal, Vol. 31, pp. 523-537.

(3) **Sornyotha, S.,** Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2010, "An efficient treatment for detoxification process of cassava starch by plant cell wall-degrading enzymes", Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 109, pp. 9-14.

(4) Tachaapaikoon, C., Tanasupawat, S., Pason, P., **Sornyotha, S.,** Waeonukul, R., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K. (2012) "*Paenibacillus xylaniclasticus* sp. nov., a xylanolytic-cellulolytic bacterium isolated from sludge in anaerobic digester", Journal of Microbiology, Vol. 50, pp. 349-400.

(5) Chimtong, S., Tachaapaikoon, C., **Sornyotha, S.,** Pason, P., Waeonukul, R., Kosugi, A. and Ratanakhanokchai, K. (2014) "Symbiotic behavior during co-culturing of *Clostridium thermocellum* NKP-2 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* NOI-1 on corn hull", BioResources, Vol. 9, pp. 2471-2483.

(6) Wongratpanya, K., Imjongjairak, S., Waeonukul, R., **Sornyotha, S.,** Phitsuwan, P., Pason, P., Nimchua, T., Tachaapaikoon, C. and Ratanakhanokchai, K. (2015) "Multifunctional properties of glycoside hydrolase family 43 from *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 including exo-β-xylosidase, endo-xylanase, and α-L-arabinofuranosidase activities", BioResources, Vol. 10, pp. 2492-2505.

การเสนอผลงานวิชาการ

(1) **Sornyotha, S.,** Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L., 2003, "Study on the binding of the polysaccharide-binding protein (P195), subunit of xylanosome from

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus circulans B6 to insoluble substrate", The 41st Kasetsart University Annual Conference, February 3-7, The Kasetsart University, Bangkok, Thailand, pp. 144-152.

(2) **Sornyotha, S.**, Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L., 2005, "Comparison of different extraction buffers for extraction of cyanide-releasing enzyme from cassava root", The 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Product, March 22-25, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, pp. 1-13.

(3) **Sornyotha, S.**, Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2008, "Reduction of linamarin content in cassava root by using xylanase and cellulase", The Pure and Applied Chemistry International Conference, January 30-February 1, Sofitel Centara Grand, Bangkok, Thailand, pp. 221-227.

(4) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Chimtong, S., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Production of high value-added products from core pineapple", Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.589-592.

(5) Tachaapaikoon, C., Buakhaw, S., **Sornyotha, S.**, Pason, P., Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Thermostable plant cell wall degrading enzymes from thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* EPPO5", Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.77-80.

(6) Pason, P., Tachaapaikoon, C., **Sornyotha, S.**, Waeonukul, R., Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Purification and characterization xylanase subunit (280 kDa) of multienzyme complex from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6", Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.97-100.

(7) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K. and Karita, S., 2011, "Identifcation of enzyme subunits that produce from *Paenibacillus* sp. TW-1", Present at the 25th meeting cellulose research, Miho village, Ibaraki, Japan.

(8) Shirasaki, R., Karita, S., **Sornyotha, S.** and Ratanakhanokchai, K., 2012, "Novel carbohydrate-binding modules from *Paenibacillus* sp. TW-1", The annual meeting of Japanese society of cellulase, Japan.

(9) **Sornyotha, S.**, Karita, S., Tachaapaikoon, C. and Ratanakhanokchai, K., 2013, "Affinity isolation and rapid identification of carbohydrate-binding proteins of xylanolytic-cellulolytic multienzyme complexs from *Paenibacillus xylaniclasticus* TW1 by MALDI-TOF/TOF MS", The 1st International Symposium on Microbial Technology for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food and Energy Security, November 25-27, The Rama Gardens Hotel, Bangkok, Thailand, pp. 281-287.

(10) นีรนุช ช่างทอง กนก รัตนะกนกชัย จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ รัตติยา แววนุกูล **สมพิศ สอนโยธา** และภัทรา ผาสอน "การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้สูงจากน้ำตาลไซโลส" การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24, 21-24 พฤษภาคม 2557 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี อำเภอหาดใหญ่ สงขลา, หน้า 17-24.

(11) Lerdpuchareekul, P., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Waeonukul, R., Kosugi, A., **Sornyotha, S.** and Ratanakhanokchai, K., 2014, "Characterization of a novel extremely thermophilic cellulolytic-xylanolytic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor* sp. EP2", MIE BIOFORUM 2014 – Lignocellulose Degradation and Biorefinery, November 18-21, Shima, Japan, pp. 83-94.

(12) **Sornyotha, S.**, Karita, S., Tsuchiya, T., Tachaapaikoon, C. and Ratanakhanokchai, K., 2014, "A novel xylan-binding CBM family 36 from multienzyme complex- producing bacterium, *Paenibacillus xylaniclasticus* TW1 : a high affinity for insoluble cellulose in addition to xylans and specificity for target carbohydrate in epidermis cell walls", MIE BIOFORUM 2014 – Lignocellulose Degradation and Biorefinery, November 18-21, Shima, Japan, pp. 111-118.

(13) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Pason, P., and Ratanakhanokchai, K., 2014, "Isolation and screening of microorganisms with potential for bioconversion of glycerol to 3-hydroxypropionic acid", The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, December 6-8, Chumphon, Thailand, p. 56.

(14) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Pason, P., and Ratanakhanokchai, K., 2015, "Enhanced 3-hydroxypropionic acid production in newly isolated pn1 using medium and condition optimization", The 13th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 6-8, Shen Zhen, China, p. 58.

(15) เอกวิชญ์ สิริอัจฉรานนท์ รัตติยา แววนุกูล ภัทรา ผาสอน **สมพิศ สอนโยธา** กนก รัตนะกนกชัย และจักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ "การโคลน การแสดงออกของยีนและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6" การประชุมทางวิชาการระดับชาติ พะเยาวิจัย ครั้งที่ 5, 28-29 มกราคม 2559 ณ หอประชุมพญางำเมือง มหาวิทยาลัยพายัพ, หน้า 423-432.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้