

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Blocks
(กรดอะดิพิคและกรดมาลิก) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

OPTIMIZATION ON BUILDING BLOCKS (ADIPIC ACID
AND MALIC ACID) PRODUCTION BY ISOLATED
BACTERIA

ชัชชฎาภา	พุทโรลิตี
ณัฐริกา	อริชฐานรัตน์
อลิศรา	บุญกอแก้ว
อังคณา	ไชยเสนา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Blocks
(กรดอะดิพิคและกรดมาลิก) โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

OPTIMIZATION ON BUILDING BLOCKS (ADIPIC ACID
AND MALIC ACID) PRODUCTION BY ISOLATED
BACTERIA

ัชชฎาภา	พทุธลลทล
ณัฐรลกา	อธลชฎานรตน์
อลลศรล	บุญก่อก่อก
อ้งคณล	ชอลยเสณล

คอรงงานพลเศนลเนลเป็นส่วนหนล่งของคอรลการคลการคลตามหลักศูตร
ปรลญญลวลทยลศลสตรบ้ณชลต (จุลชลวลทยลอุตศลหกรรรม)
ภลคवलชลวลทยล คณะवलทยลศลสตร
ศลถลบ้นเทคโนลลยลพระจอมเกลลลจ้ลคณทลหลรลลตกรลระบ้ง
ป้การคลการคล 2558

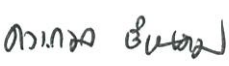


OPTIMIZATION ON BUILDING BLOCKS (ADIPIC ACID
AND MALIC ACID) PRODUCTION BY ISOLATED
BACTERIA

CHATSADAPA	PUTTHOSIT
NATTHARIKA	ATHITTHANRAT
ALISARA	BOONKUAKEA
ANGKHANA	CHAISENA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Blocks (กรดอะดิพิคและกรดมาลิก) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ Optimization on Building Blocks (Adipic Acid and Malic Acid) Production by Isolated Bacteria		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชัชชฎาภา พุทธิสิทธิ์	รหัสนักศึกษา	55051261
	นางสาวณัฐริกา อธิษฐานรัตน์	รหัสนักศึกษา	55051277
	นางสาวอลิศรา บุญก่อเกื้อ	รหัสนักศึกษา	55051429
	นางสาวอังคณา ไชยเสนา	รหัสนักศึกษา	55051431
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สมพิศ สอนโยธา		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม ประธานกรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย กรรมการ	
ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Blocks (กรดอะดีพิคและกรดมาลิก) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชัชชฎาภา พุทโธสิทธิ์	รหัสนักศึกษา	55051261
	นางสาวณัฐริกา อธิษฐานรัตน์	รหัสนักศึกษา	55051277
	นางสาวอลิศรา บุญก่อเกื้อ	รหัสนักศึกษา	55051429
	นางสาวอังคณา ไชยเสนา	รหัสนักศึกษา	55051431
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สมพิศ สอนโยธา		

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกได้แก่ ไอโซเลท MG3 LG1 NG6 และ BX1 โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA พบว่าไอโซเลท MG3 มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus warneri* ร้อยละ 96 ไอโซเลท LG1 มีความคล้ายคลึงกับ *Pluralibacter gergoviae* ร้อยละ 99 ไอโซเลท NG6 มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus* sp. ร้อยละ 78 และไอโซเลท BX1 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter persici* ร้อยละ 99 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น และผลของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก พบว่าไอโซเลท MG3 LG1 และ NG6 สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้ความเข้มข้นสูงสุด 0.344 ± 0.112 16.758 ± 0.323 และ 0.312 ± 0.222 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และไอโซเลท BX1 สามารถผลิตกรดมาลิกได้ความเข้มข้นสูง 33.104 ± 0.501 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และจากการศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม พบว่าไอโซเลท MG3 LG1 และ NG6 สามารถผลิตกรดอะดีพิคความเข้มข้นสูงสุด 0.440 ± 0.104 15.695 ± 0.254 และ 0.049 ± 0.170 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และไอโซเลท BX1 สามารถผลิตกรดมาลิกได้ความเข้มข้นสูงสุด 0.105 ± 0.168 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : กรดมาลิก กรดอะดีพิค กลูโคส แคลเซียมคาร์บอเนต ไซโลส

Title	Optimization on Building Blocks (Adipic Acid and Malic Acid) Production by Isolated Bacteria		
Students	Miss Chatsadapa	Putthosit	Student ID 55051261
	Miss Nattharika	Athitthanrat	Student ID 55051277
	Miss Alisara	Boonkuakea	Student ID 55051429
	Miss Angkhana	Chaisena	Student ID 55051431
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Dr. Somphit Sornyotha		

Abstract

This special project was identified the bacteria which ability to produce adipic acid or malic acid, the isolates MG3, LG1, NG6 and BX1. Based on 16S rRNA gene analysis showed that the isolate MG3 was closely related to *Staphylococcus warneri* with 96% sequence similarity, the isolate LG1 was closely related to *Pluralibacter gergoviae* with 99% sequence similarity, the isolate NG6 was belonged within the genus *Staphylococcus* (sequence identity, 78%) and the isolate BX1 was closely related to *Acetobacter persici* with 99% sequence similarity. In addition, the effect of the initial carbon source and calcium carbonate concentrations on adipic acid or malic acid production were also examined. The results found that the isolates MG3, LG1 and NG6 were produced the highest concentration of adipic acid at 0.344 ± 0.112 , 16.758 ± 0.323 and 0.312 ± 0.222 g/L, respectively, when using an initial glucose concentration of 100 g/L as the carbon source. The isolate BX1 was produced the highest concentration of malic acid at 33.104 ± 0.501 g/L when using an initial xylose concentration of 100 g/L as the carbon source. For the effect of the initial calcium carbonate concentration, the results showed that the isolates MG3, LG1 and NG6 were produced the highest concentration of adipic acid at 0.440 ± 0.104 , 15.695 ± 0.254 and 0.049 ± 0.170 g/L, respectively, when containing 30 g/L of calcium carbonate in the medium and the isolate BX1 was produced malic acid with a highest concentration at 0.105 ± 0.168 g/L when containing 30 g/L of calcium carbonate in the medium.

Keywords : Malic acid, Adipic acid, Glucose, Calcium carbonate, Xylose

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากคณะผู้จัดทำได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงการพิเศษนี้ อีกทั้งยังช่วยเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ตลอดจนการตรวจแก้โครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม และ ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาจนทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารสถานที่ คณะวิทยาศาสตร์ ตลอดจนแม่บ้านประจำตึกทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดาซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจคณะผู้จัดทำเสมอมา

นอกจากนี้ขอขอบคุณ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการจัดทำโครงการพิเศษนี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หากโครงการพิเศษฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ชัชฎาภา	พุทโธสิทธิ์
ณัฐริกา	อธิษฐานรัตน์
อลิศรา	บุญก่อเกื้อ
อังคณา	ไชยเสนา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 กรดอะดิพิก.....	3
2.2 การสังเคราะห์กรดอะดิพิกทางเคมี (Chemical synthesis of adipic acid).....	6
2.3 การสังเคราะห์กรดอะดิพิกทางชีวภาพ (Biosynthesis of Adipic acid).....	7
2.3.1 การสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิคจากน้ำตาลกลูโคส	7
2.3.2 การสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิคจากเบนโซเอต.....	8
2.3.3 การสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิคจากสารอะโรมาติกที่สกัดได้จากลิกนิน ...	10
2.3.4 การสังเคราะห์กรดกลูคาร์ริก (Glucaric acid) จากกลูโคส	12
2.3.5 การสังเคราะห์กรดอะดิพิกจากกลูโคสผ่านทางวิถี α -aminoadipate	14
2.3.6 การสังเคราะห์กรดอะดิพิกจากสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาว.....	15
2.4 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดอะดิพิก	17
2.5 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดิพิก	19
2.6 กรดมาลิก.....	22
2.7 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยกระบวนการทางเอนไซม์	24
2.8 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการหมักของจุลินทรีย์	25
2.8.1 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยยีสต์.....	25
2.8.2 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยเชื้อรา.....	31
2.9 แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดมาลิก	33
2.10 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิก.....	34
2.11 สภาพที่เหมาะสมในการสังเคราะห์กรดมาลิก	35
2.12 High performance liquid chromatography (HPLC).....	42
2.12.1 ตัวทำละลาย HPLC Solvent.....	42
2.12.2 เครื่องสูบ (Pump).....	43
2.12.3 หัวฉีด (Injector).....	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.12.4 คอลัมน์ (Column).....	43
2.12.5 ตัวตรวจจับสาร (Detector).....	43
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	44
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	44
3.2 สารเคมี.....	45
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	46
3.3.1 แแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษา	46
3.3.2 การตรวจสอบการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก.....	46
3.3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิค พีซีอาร์และฐานข้อมูลทางชีวภาพ	47
3.3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	51
3.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิคโดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 หรือกรดมาลิกโดยไอโซเลต BX1.....	52
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	54
4.1 แแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษา	54
4.2 การตรวจสอบการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก.....	54
4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และ ฐานข้อมูลทางชีวภาพ.....	56
4.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก	56
4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก	63
4.5.1 การศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิคหรือ กรดมาลิก	63
4.5.2 การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิต กรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก.....	82
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	101
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	101
5.2 ข้อเสนอแนะ	101
เอกสารอ้างอิง	102
ภาคผนวก.....	108
ภาคผนวก ก.....	109
ภาคผนวก ข.....	111
ภาคผนวก ค.....	113
ภาคผนวก ง	115

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะดีพิค.....	20
2.2 ค่าการทำงานของเอนไซม์ (mU/mg) ระหว่างสายพันธุ์ K1001 กับ No.28 ที่มีส่วนร่วม ในเมตาบอลิซึมของกรดมาลิก.....	28
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้.....	35
2.4 การผลิตกรดมาลิกโดย <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ที่มีอัตราการกวนแตกต่างกัน.....	36
2.5 การผลิตกรดมาลิกโดย <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน.....	37
2.6 การผลิตกรดมาลิกโดย <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ที่มีความเข้มข้นของไอออนโลหะ แตกต่างกัน.....	38
2.7 การผลิตกรดมาลิกโดย <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตแตกต่างกัน.....	39
2.8 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิก ร้อยละผลได้ และค่าผลิตภาพเมื่อเพาะเลี้ยง <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกต่ำและสูง.....	40
3.1 ส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	49
4.1 แสดงผลการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกโดยเปรียบเทียบจากการศึกษาก่อนหน้านี้.....	55
4.2 แสดงการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์.....	56
4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1.....	57
4.4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก.....	62
4.5 แสดงผลการผลิตกรดอะดีพิคและร้อยละผลได้จาก การเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกัน.....	64
4.6 แสดงผลการผลิตกรดอะดีพิคและร้อยละผลได้จาก การเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1 ในแหล่ง คาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกัน.....	77
4.7 แสดงผลการผลิตกรดอะดีพิคและร้อยละผลได้จาก การเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ในแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีปริมาณแตกต่างกัน.....	82
4.8 แสดงผลการผลิตกรดอะดีพิคและร้อยละผลได้จาก การเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1 ใน แคลเซียมคาร์บอเนตที่มีปริมาณแตกต่างกัน.....	95
ข1 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ.....	110
ข2 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิก.....	111
ข3 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิก.....	112
ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือโซโลสที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	113

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 สูตรโครงสร้างกรดอะมิโน	3
2.2 กระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนทางเคมี (A) การสังเคราะห์กรดอะมิโนดั้งเดิมที่ใช้เบนซีนเป็นสารตั้งต้น (B) การลดปริมาณก๊าซไนโตรสออกไซด์อิสระโดยการใช้ไซโคลเฮกเซนเป็นสารตั้งต้น ใช้ไอโซนและแสงยูวีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (C) การสังเคราะห์กรดอะมิโนโดยการออกซิเดชันของไซโคลเฮกเซน ในสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 ในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีฮาโลเจนอิสระ	4
2.3 การผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	5
2.4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนด้วยกระบวนการทางเคมี โดยใช้เบนซีนเป็นสารตั้งต้น	6
2.5 การสังเคราะห์กรดซีสซิมิวโคนิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น	8
2.6 การสังเคราะห์กรดซีสซิมิวโคนิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เบนโซเอตที่ใช้เป็นสารตั้งต้น	9
2.7 การสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพ โดยอาศัยสารประกอบอะโรมาติกของลิซีน	11
2.8 (A) วิธีการสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพ โดยอาศัยกรดซีสซิมิวโคนิค (B) วิธีการสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพ โดยอาศัยกรดกลูตาริก	13
2.9 กระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพผ่านวิถี α -aminoadipate โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น	15
2.10 การสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพ โดยอาศัยสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาว (A) การสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพ โดยอาศัยสารตั้งต้นที่เป็นกลูโคส (B) การสังเคราะห์กรดอะมิโนทางชีวภาพ โดยอาศัยสารตั้งต้นที่เป็นกรดไขมัน	16
2.11 การสังเคราะห์กรดอะมิโนจากกลูโคสและเบนซีน	18
2.12 โครงสร้างทางเคมีของกรดมาลิก	22
2.13 วัฏจักรเครบส์	23
2.14 กระบวนการทางเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์กรดมาลิก	24
2.15 การสังเคราะห์กรดมาลิกใน <i>S. cerevisiae</i> มี 4 วิธี โดยใช้ oxaloacetate และ/หรือ acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้น (I) กระบวนการ reduction ของ oxaloacetate (II) กระบวนการ Oxidation ของ citrate ผ่านวัฏจักร TCA (III) การสังเคราะห์จาก acetyl-CoA ผ่าน cyclic glyoxylate route (IV) การสังเคราะห์จาก acetyl-CoA และ oxaloacetate ผ่าน noncyclic glyoxylate route (OAA, oxaloacetate; MAL, malate; CIT, citrate; ICI, isocitrate; AKG, α -ketoglutarate; SUCC, succinyl-CoA; SUC, succinate; FUM, fumarate; C2, acetyl-CoA; Yspmax, maximum theoretical yield (in mol malate per mol glucose)	26
2.16 (A) การสังเคราะห์เอทานอล (B) การสังเคราะห์กรดมาลิก โดยยีสต์สาย S. cerevisiae สายพันธุ์ K1001 กับ No.28	27

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.17 วิธีการสังเคราะห์กรดมาลิกในยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้ oxaloacetate และ/หรือ acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้น (OAA oxaloacetate, MAL malate, CIT citrate, ICI isocitrate, AKG α -ketoglutarate, SUCC succinyl-CoA, SUC succinate, FUM fumarate).....	29
2.18 การสังเคราะห์กรดมาลิกผ่านวิถี rTCA (PYC pyruvate carboxylase, MDH malate ... dehydrogenase)	30
2.19 (A) การสังเคราะห์กรดมาลิกและซีวามอลโดย <i>Aspergillus</i> sp. (B) ผลได้ของกรดมาลิกโดย <i>Aspergillus</i> sp.....	31
2.20 จลนศาสตร์ของการผลิตกรดมาลิกเมื่อเพาะเลี้ยง <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกต่ำ.....	40
2.21 จลนศาสตร์ของการผลิตกรดมาลิกเมื่อเพาะเลี้ยง <i>A. flavus</i> สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกสูง	41
2.22 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC	42
4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต MG3 NG6 LG1 และ BX1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	59
4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต MG3 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	65
4.3 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต MG3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร.....	68
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต LG1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	69
4.5 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต LG1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร.....	72
4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต NG6 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	73
4.7 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต NG6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร.....	76
4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต BX1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต BX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นโซลอสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร.....	81
4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต MG3 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร	83
4.11 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต MG3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร .	86
4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต LG1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร	87
4.13 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต LG1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร .	90
4.14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต NG6 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร	91
4.15 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต NG6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร .	94
4.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต BX1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นโซลอสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร	96
4.17 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต BX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นโซลอสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร.	99

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดอะดิพิค (Adipic acid) หรือกรดเฮกเซนไดโออิก (Hexanedioic acid) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทคาร์บอกซิลิกที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ เชื่อมต่อกับคาร์บอน 6 อะตอม มีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{10}O_4$ โดยกรดอะดิพิคนั้นเป็นกรดที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากทางด้านอุตสาหกรรม ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต nylon-6,6 เรซิน เส้นใยพรม น้ำมันหล่อลื่น ชิ้นส่วนรถยนต์ เสื้อผ้าและอีกมากมายหลายชนิดที่ใช้ในชีวิตประจำวัน (Blach และคณะ, 2010; Suren และคณะ, 2013) สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้จากแหล่งปิโตรเคมีโดยการออกซิเดชัน (Oxidation) ของไซโคลเฮกซานอล (Cyclohexanol) และไซโคลเฮกซานอน (Cyclohexanone) เร่งปฏิกิริยาโดยกรดไนตริก ซึ่งกระบวนการผลิตทางเคมีนี้ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกและมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมตามมา จึงได้มีการพยายามจะผลิตกรดอะดิพิคโดยกระบวนการทางชีวภาพจากแหล่งคาร์บอนทางธรรมชาติขึ้นมาเพื่อลดมลพิษดังกล่าว (Yu และคณะ, 2016)

กรดมาลิก (Malic acid) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ประเภทคาร์บอกซิลิกที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ เชื่อมต่อกับคาร์บอน 4 อะตอม มีสูตรโมเลกุล คือ $C_4H_6O_5$ เป็นสารตัวกลางในวัฏจักร Tricarboxylic acid (TCA cycle) และเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางทางด้านเภสัชกรรม โดยใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคระดับแอมโมเนียในเลือดสูง หรืออาการเจ็บป่วยเรื้อรัง เป็นต้นทางด้านอุตสาหกรรมอาหารใช้ประโยชน์หลักในการเพิ่มรสชาติอาหาร และใช้เป็นสารในการบ่มไวน์ นอกจากนี้กรดมาลิกยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโพลีเมอร์ต่างๆ เช่น พลาสติก เส้นใย และยาง เป็นต้น ได้อีกด้วย (Gok และคณะ, 2014) สามารถผลิตกรดมาลิกได้โดยการไฮเดรชัน (Hydration) ของกรดมาเลอิก (Maleic acid) หรือกรดฟูมาริก (Fumaric acid) ซึ่งกระบวนการผลิตทางเคมีนี้มีกระบวนการที่ละเอียดและซับซ้อน ในขณะที่กระบวนการผลิตทางชีวภาพซึ่งมีทั้งการใช้เอนไซม์และการใช้เซลล์โดยตรง แต่การใช้เอนไซม์ในการผลิตกรดมาลิกนั้นมีราคาค่อนข้างสูงซึ่งทำให้ยากต่อการนำมาใช้งานได้จริง จึงได้มีการศึกษาโดยใช้กระบวนการผลิตทางชีวภาพ ซึ่งใช้รา *Aspergillus* และ *Schizophyllum commune* มาทดลองผลิตกรดมาลิก พบว่าประสิทธิภาพในการผลิตกรดมาลิกที่ได้นั้นมีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้น Moon และคณะ (2008) จึงได้ทำการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมาลิกให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์กลายมาทำการผลิตกรดมาลิกแทน (Moon และคณะ, 2008)

จากข้อมูลข้างต้น พบว่าทั้งกรดอะดิพิคและกรดมาลิกซึ่งเป็นสาร Building Blocks เมื่อทำการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมีก่อให้เกิดผลเสียหลายอย่างตามมา ปกัสสร เทพภักดิ์ และ สุพรรณิกา ยอดสง่า (2014) จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 หรือสังเคราะห์กรดมาลิกโดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไอโซเลต BX1 งานวิจัยนี้สนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคและกรดมาลิกให้ได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น โดยใช้แบคทีเรียไอโซเลต LG1 NG6 และ MG3 ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้จากการหมักกลูโคสและแบคทีเรียไอโซเลต BX1

ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้จากการหมักไซโลส เพื่อลดต้นทุนการผลิต ลดมลพิษที่เกิดจากการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกทางเคมี และอาจนำไปใช้ประยุกต์ได้ในอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิกได้
- 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก เช่น ปริมาณแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาอัตราการผลิตกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิกได้ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ โดยตรวจสอบปริมาณกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก ปริมาณแหล่งคาร์บอน และพีเอช ณ เวลาต่างๆ

2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย เพื่อสังเคราะห์กรดอะดีพิค หรือกรดมาลิกได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เช่น ปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น เป็นต้น

3) จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดีพิค หรือกรดมาลิกได้ โดยวิธี 16S rRNA sequence analysis

4) ตรวจสอบปริมาณกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิกที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้ โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

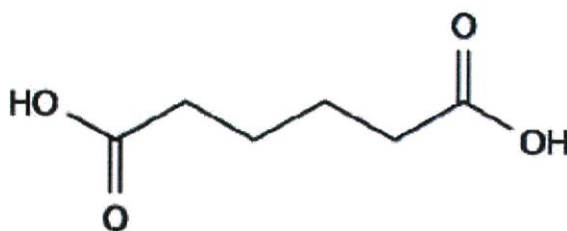
- 1) ให้แบคทีเรียสามารถสังเคราะห์กรดอะดีพิค หรือกรดมาลิกได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น
- 2) สามารถทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกได้
- 3) สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกได้
- 4) ลดต้นทุนในการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก
- 5) สามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยอื่นๆ ได้
- 6) ลดมลพิษที่อาจจะเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์กรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกทางเคมี

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดอะดิพิค

กรดอะดิพิค (Adipic acid) มีชื่อ IUPAC คือ กรดเฮกเซนไดโออิก (Hexanedioic acid) และมีชื่ออื่นๆ ได้แก่ 1,4-Butanedicarboxylic acid, Octafluorohexanedioic acid, Acifloctin, Acinetten และ Adipinic acid มีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{10}O_4$ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 กรดอะดิพิคเป็นกรดไดคาร์บอกซิลิก (Dicarboxylic acid) ที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์เป็นอย่างมาก มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 146.14 กรัมต่อโมล ลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง สีขาว ไม่มีกลิ่น มีจุดเดือดที่ 337.5 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวที่ 150.9 องศาเซลเซียส ละลายน้ำเล็กน้อย ละลายในอะซิโตน และละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ มีค่า pK_a เท่ากับ 4.43 และ 5.41 (Musser, 2005; Bohnet, 2003; กรมควบคุมมลพิษ, 2001)

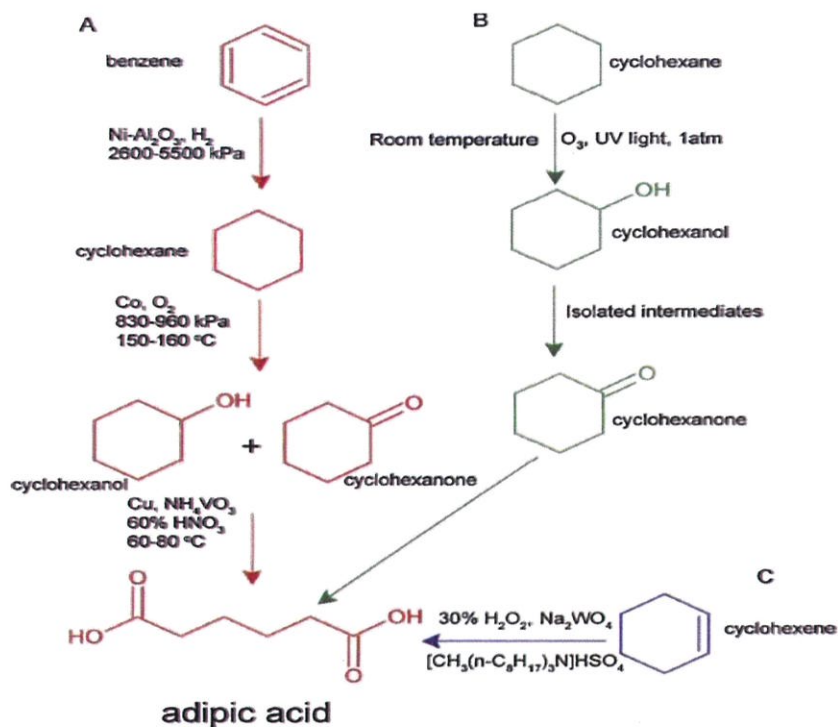


รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างกรดอะดิพิค

ที่มา : http://www.solvay.com/en/bina/Adipic_acid_GPS_rev0_Nov12_RHD-138953.pdf

ในทางอุตสาหกรรมกรดอะดิพิคซึ่งอยู่ในรูปผลึกของแข็งสีขาว (Crystalline white solid) ใช้เป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในการผลิตไนลอน 6,6 โพลีเอไมด์ (nylon-6,6 polyamide) ค้นพบในช่วงต้นคริสต์ศตวรรษที่ 1930 โดย W.H. Carothers of DuPont (Luedeke, 1977; Trautwein และคณะ, 2014) ในปี 2010 มีการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทั่วโลกสูงสุดถึง 2.6 ล้านตัน และคาดการณ์ว่าจะมีการสังเคราะห์สูงถึง 3.3 ล้านตันในปี 2016 (Merchant Research & Consulting Ltd., 2011) กรดอะดิพิคประมาณร้อยละ 65 ของปริมาณที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นทั้งหมดถูกใช้ในการผลิตไนลอนและเรซินบางชนิด นอกจากนี้กรดอะดิพิคยังใช้ในการผลิตโพลียูรีเทน (Polyurethanes) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (Reactant) สำหรับการผลิตพลาสติกไซเซออร์ (Plasticizers) สารหล่อลื่น (Lubricant components) และพอลิเอสเตอร์พอลิโออล (Polyester polyols) นอกจากนี้กรดอะดิพิคยังใช้เป็นส่วนผสมในเจลาติน (Gelatins) เพื่อใช้ทำของหวาน และอาหารอื่นๆที่ต้องการความเป็นกรด (Merchant Research & Consulting Ltd., 2011; Musser, 2005)

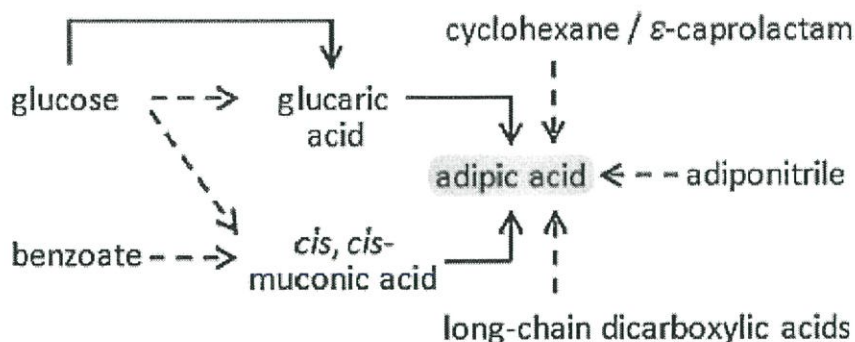
การสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยกระบวนการทางเคมีในทางอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่เกิดจากการออกซิเดชัน (Oxidation) ของน้ำมัน KA ซึ่งเป็นสารผสมของไซโคลเฮกซานอล (Cyclohexanol) และไซโคลเฮกซาโนน (Cyclohexanone) เร่งปฏิกิริยาโดยกรดไนตริก (Nitric acid) (Myers และคณะ, 2001; Trautwein และคณะ, 2014) ไซโคลเฮกซานอลและไซโคลเฮกซาโนนผลิตจากน้ำมันเบนซิน (Benzene) และกระบวนการนี้ก่อให้เกิดไนตรัส (N_2O) ไนโตรเจนออกไซด์ (Nitrogen oxides) คาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbon monoxide) และสารประกอบที่เป็นอันตรายอื่นๆดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์กรดอะดิคติกทางเคมี (A) การสังเคราะห์กรดอะดิคติกดั้งเดิมที่ใช้เบนซีนเป็นสารตั้งต้น (B) การลดปริมาณก๊าซไนตรัสออกไซด์อิสระโดยการใช้ไซโคลเฮกเซนเป็นสารตั้งต้น ใช้โอโซนและแสงยูวีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (C) การสังเคราะห์กรดอะดิคติกโดยการออกซิเดชันของไซโคลเฮกเซน ในสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 ในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีฮาโลเจนอิสระ

ที่มา : Ma และคณะ (2015)

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีสะอาดเป็นกุญแจสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจ ซึ่งจะรวมถึงการผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีความประหยัดมากขึ้น เนื่องจากใช้ชีวมวลที่สามารถสร้างทดแทนได้ใหม่ (Biorenewables) (Cooke, 2008; Kircher, 2006) เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายกับการสังเคราะห์กรดอะดิคติกโดยกระบวนการทางปิโตรเคมี พบว่าการสังเคราะห์กรดอะดิคติกทางชีวภาพมีความได้เปรียบทางด้านต้นทุนประมาณร้อยละ 20-30 (Guzman, 2010) นอกจากนี้กระบวนการสังเคราะห์กรดอะดิคติกทางชีวภาพโดยการหมัก (Fermentation) จะใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (Polen และคณะ, 2012) ดังนั้นจึงมีความต้องการทรัพยากรหมุนเวียนทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้นเพื่อที่จะผลิตกรดอะดิคติก โดยทำให้น้ำตาลเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพไปเป็นกรดอะดิคติก ซึ่งมีกรดซิสซิสมิวโคนิก (Cis,cis-muconic acid) และกรดกลูคาร์ริก (Glucaric acid) เป็นสารตัวกลาง (Intermediate) และอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดอะดิคติกตามลำดับ ดังรูปที่ 2.3 และเป็นวิธีการที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง ซึ่งกรดซิสซิสมิวโคนิกสามารถผลิตได้จากกลูโคส โดยการใช้ *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดซิสซิสมิวโคนิก (Lin และคณะ, 2014; Niu และคณะ, 2002)

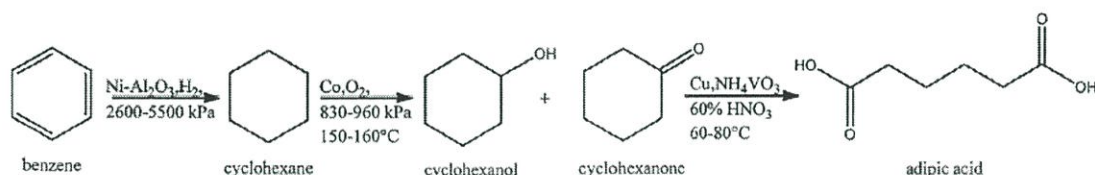


รูปที่ 2.3 การผลิตกรดอะดิพิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพ
ที่มา : Polen และคณะ (2012)

ในธรรมชาติกรดอะดิพิคสามารถพบได้ในหัวบีทและบีทรูทสีแดง หรือในการเผาผลาญระดับเซลล์ โดยกรดอะดิพิคเป็นสารตัวกลางในวิถีการสลายของไซโคลเฮกเซน ไซโคลเฮกซานอล ไซโคลเฮกซาโนน และ ϵ -คาโพรแลคตัม (ϵ -caprolactum) ที่พบใน *Pseudomonas* บางสายพันธุ์ (Cheng และคณะ, 2002; Steffensen และ Alexander, 1995) การสลายสารเหล่านี้ส่งผลให้เกิดอะดิเพตเซมิแอลดีไฮด์ (Adipatesemialdehyde) ซึ่งจะถูกรีดออกซิไดซ์ต่อไปเป็นกรดอะดิพิคโดยเอนไซม์ 6-ออกโซเฮกซาโนเอตดีไฮโดรจีเนส (6-oxohexanoate dehydrogenase) เอนไซม์นี้ต้องการ NADP^+ เป็นโคเอนไซม์ซึ่งพบใน *Acinetobacter* sp. (Iwaki และคณะ, 1999) และอีกวิธีหนึ่งคือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์ NADP^+ -dependent aldehyde dehydrogenases ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอะลิฟาติกแอลดีไฮด์ (Aliphatic aldehydes) สายยาว เพื่อให้กลายเป็นกรดอะดิพิค (Ahvazi และคณะ, 2000) จากนั้นกรดอะดิพิคจะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็นอะดิพิลโคเอ (Adipyl-CoA) และสลายตัวเป็นซักซินิลโคเอ (Succinyl-CoA) และอะซิetylโคเอ (Acetyl-CoA) ต่อไป (Ahvazi และคณะ, 2000; Chapman และ Duggleby, 1967; Cheng และคณะ, 2000) นอกจากนี้กรดอะดิพิคยังสามารถเกิดขึ้นจากการสลายของกรดไตรคาร์บอกซิลิกสายยาวในตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cerdan และคณะ, 1988) อีกทั้งยังเกิดจากอะดิพอนไนไตรท์ (Adiponitrile) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มไนไตรท์ (nitrile) และเป็นสารสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย พลาสติก ยางสังเคราะห์ ยา หรือสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น (Levy-Schil และคณะ, 1995) แต่เนื่องจากไนไตรท์มีความเป็นพิษ การสลายสารนี้จึงมีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและการใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมจึงต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรเลส (Nitrilase) ที่สูงขึ้นเพื่อการสังเคราะห์กรดอะดิพิคอีกด้วย (Bayer และคณะ, 2011 ; Levy-Schil และคณะ, 1995)

2.2 การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางเคมี (Chemical synthesis of adipic acid)

การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางเคมีเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต nylon-6,6 และใยสังเคราะห์เริ่มขึ้นในช่วงต้นทศวรรษที่ 1930 โดย W.H. Carothers จากบริษัท DuPont (Luedeke, 1977) ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่กระบวนการผลิตทางเคมีถูกคิดค้นขึ้นเพื่อที่จะสังเคราะห์กรดอะดิพิค (Merchant Research & Consulting Ltd., 2011) ในการสังเคราะห์เชิงพาณิชย์เกือบทั้งหมด สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะดิพิคคือ เบนซีน โดยกระบวนการสังเคราะห์ เริ่มจากเบนซีนถูกรีดิวซ์กลายเป็นไซโคลเฮกเซน ต่อมาไซโคลเฮกเซนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสองขั้นตอนเกิดเป็นสารผสมระหว่างไซโคลเฮกซาโนนและไซโคลเฮกซานอล สุดท้ายส่วนผสมทั้งสองนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะดิพิค โดยการเติมกรดไนตริกและอากาศ และการใช้ทองแดงหรือวานาเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Niu และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะดิพิคด้วยกระบวนการทางเคมี โดยใช้เบนซีนเป็นสารตั้งต้น
ที่มา : Niu และคณะ (2002)

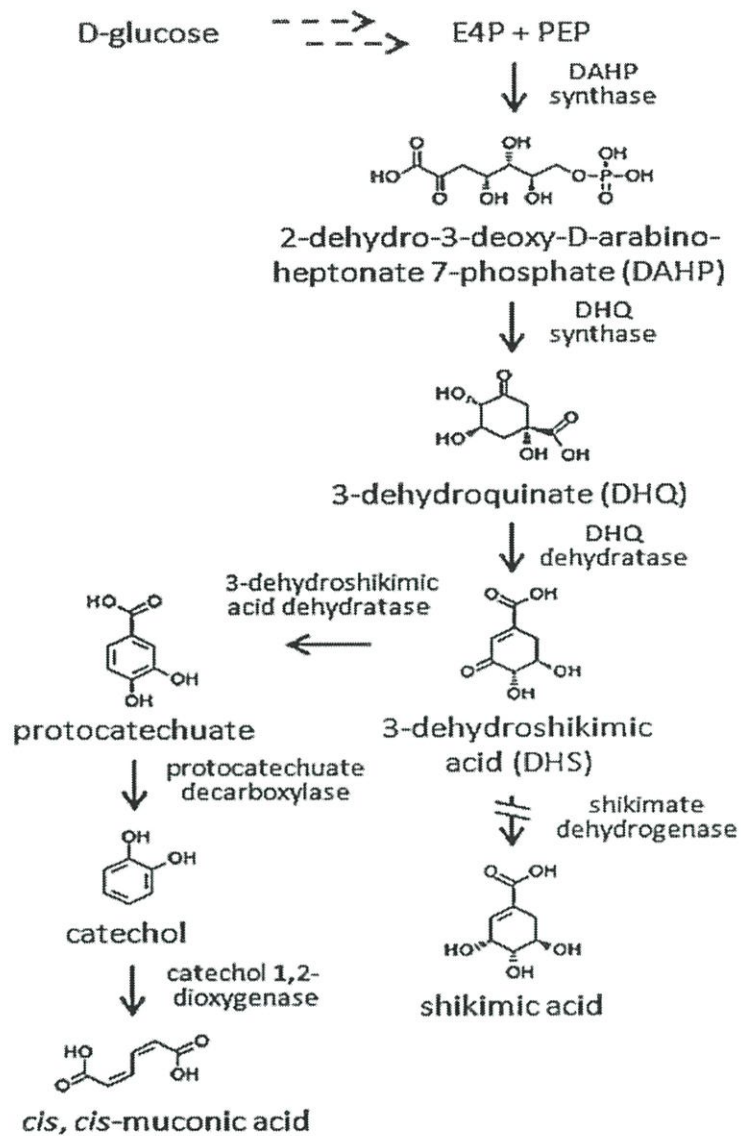
ข้อเสียของกระบวนการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางอุตสาหกรรมด้วยกระบวนการทางเคมีมีมากมาย อาทิเช่น ให้ผลผลิตโดยรวมที่ต่ำ โดยให้อัตราผลผลิตเพียงร้อยละ 4-11 ทั้งยังเกิดการกัดกร่อนภายในถังปฏิกรณ์ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของกรดไนตริก เกิดการปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก และมีการประมาณการณ์ว่าก๊าซไนตรัสออกไซด์ 0.3 กิโลกรัม ถูกผลิตขึ้นในกระบวนการเมื่อมีการผลิตกรดอะดิพิค 1 กิโลกรัม (Cavani และ Eles, 2009) รวมถึงมีการใช้พลังงานในการผลิตสูง (Hwang และ Sagadevan, 2014) เมื่อเห็นถึงปัญหาดังกล่าว Alini และคณะ (2007) จึงได้มีการพัฒนากระบวนการสังเคราะห์กรดอะดิพิค โดยทำให้ก๊าซไนตรัสออกไซด์สลายตัวเพื่อลดการสร้างก๊าซไนตรัสออกไซด์ให้น้อยลง และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ด้วยการสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากไซโคลเฮกเซน โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซโคลเฮกเซน ซึ่งประกอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 ในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีฮาโลเจนอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Sato และคณะ, 1998; Blach และคณะ, 2010) กระบวนการนี้ถูกยอมรับว่าเป็น “กระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม” เนื่องจากลดการสร้างก๊าซเรือนกระจก ดังรูปที่ 2.2 (C) และเมื่อไม่นานมานี้ กระบวนการลดการเกิดไนตรัสออกไซด์อิสระระหว่างการการสังเคราะห์กรดอะดิพิคถูกรายงานโดย Hwang และ Sagadevan (2014) ดังรูปที่ 2.2 (B) โดยในการสังเคราะห์ได้มีการพ่นก๊าซโอโซนลักษณะเป็นฟองไปยังไซโคลเฮกเซน ร่วมกับการฉายรังสียูวีที่อุณหภูมิห้อง และมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งในวิธีการนี้กรดอะดิพิคจะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเวลา 2-8 ชั่วโมง

2.3 การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ (Biosynthesis of Adipic acid)

เนื่องจากการสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยกระบวนการทางเคมีสร้างผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก จึงทำให้การสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยกระบวนการทางชีวภาพได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจก ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญยิ่งในปัจจุบัน โดยมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นทางชีวภาพที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะดิพิค แต่ยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก (Polen และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามการใช้สารตั้งต้นในทางชีวภาพ เช่น กรดซิสซิสมิวโคนิก (*cis,cis*-muconic acid) หรือกรดกลูคาร์ริก (glucaric acid) ตามด้วยการเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ได้ประสบความสำเร็จ และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะดิพิค (Niu และคณะ, 2002) นอกจากนี้สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะดิพิคยังมีหลากหลายชนิด เช่น กลูโคส เบนโซเอท ไฮโคลเฮกเซน และ *E*-คาโพรแลกตัม เป็นต้น (Polen และคณะ, 2013)

2.3.1 การสังเคราะห์กรดซิสซิสมิวโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส

การสังเคราะห์กรดซิสซิสมิวโคนิกทางชีวภาพได้รับการศึกษาอย่างจริงจัง เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การสังเคราะห์หลักๆมีสองวิธีด้วยกัน คือการสังเคราะห์กรดซิสซิสมิวโคนิกจากกลูโคสโดยตรงและการสลายสารอะโรมาติกเพื่อที่จะเปลี่ยนเป็นกรดซิสซิสมิวโคนิกต่อไป การสังเคราะห์กรดซิสซิสมิวโคนิกจากกลูโคสโดยอาศัยเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์กลาย ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Draths และ Frost (1994) เริ่มต้นจากการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรด 3-dehydroshikimic (DHS) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิถีการสังเคราะห์ ที่เกิดจากวิถีชิกามาเท (Shikimate pathway) โดยอาศัยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์กลายซึ่งมีพลาสมิด AB2834 ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ซิกิเมทดีไฮโดรจีเนส (shikimate dehydrogenase) และพลาสมิด pKD 136 ซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ทรานคีโตเลส (Transketolase) เอนไซม์ดีเอชคิว ซินเทส (DHQ synthase) (Yi และคณะ, 2003; Li และ Frost, 1999) จากนั้นอาศัยพลาสมิด pKD 8.292 ประกอบด้วยยีนที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ DHS ไปเป็นกรดซิสซิสมิวโคนิก โดยเริ่มจากการเปลี่ยน DHS ไปเป็นโปรโตแคททีคูเอตซึ่งอาศัยปฏิกิริยาดีไฮเดรชัน (Dehydration) โดยเอนไซม์ ดีเอชเอสดีไฮเดรเตส (DHS dehydratase) ที่สร้างจากยีน *aroZ* และโปรโตแคททีคูเอตเปลี่ยนไปเป็นแคททีคอล (Catechol) โดยอาศัยเอนไซม์โปรโตแคททีคูเอต ดี-คาร์บอกซีเลส สร้างจากยีน *aroY* ตามลำดับ สุดท้ายเอนไซม์แคททีคอล 1,2 ไดออกซีจีเนส (Catechol 1,2 dioxygenase) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแคททีคอล (Catechol) ไปเป็นกรดซิสซิสมิวโคนิก เมื่อเติมตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นแพลทตินัมในคาร์บอนลงไป จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือกรดอะดิพิค ดังรูปที่ 2.5



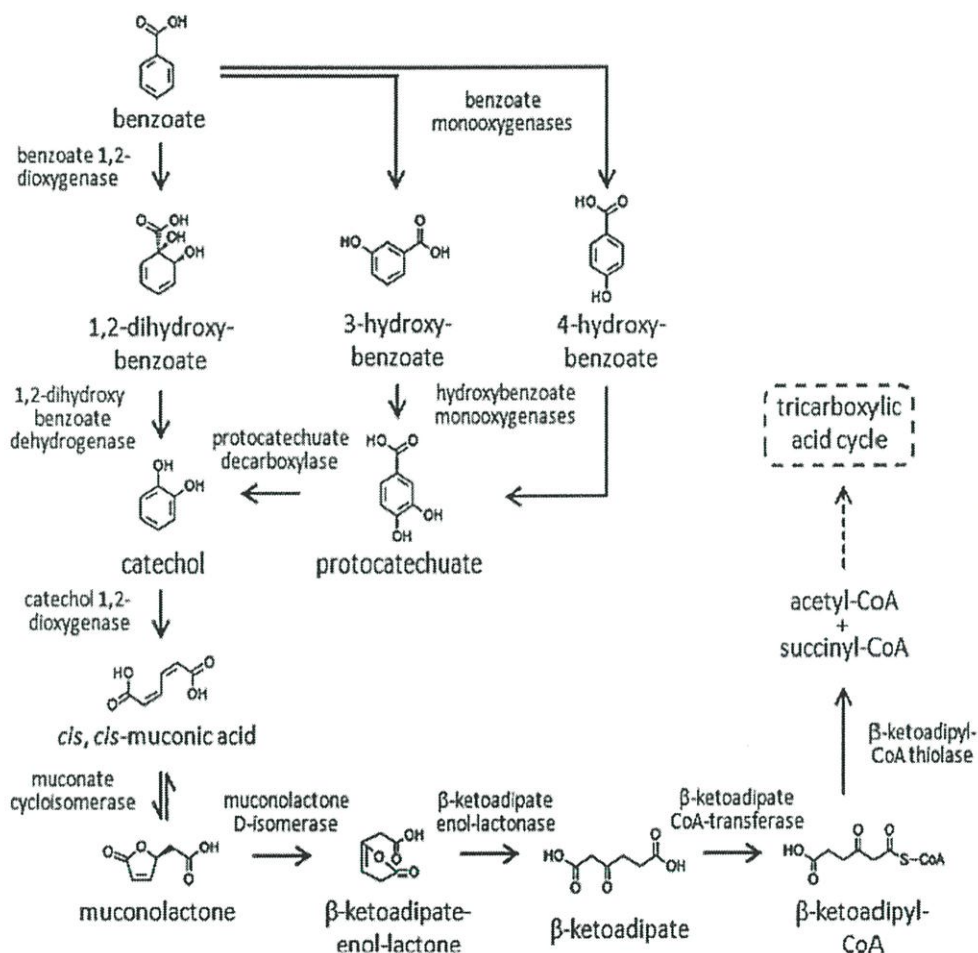
รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น

ที่มา : Draths และ Frost (1994)

2.3.2 การสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกจากเบนโซเอต

วิถีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกจากเบนโซเอต คือวิถี ortho-cleavage (ortho-cleavage pathway) ของแคทีคอล (Catechol) ซึ่งกรดซิสซิมิวโคนิกถูกเปลี่ยนไปเป็นซัคซินิลโคเอและอะซีติลโคเอ ในวิถี ketoadipate (ketoadipate pathway) ดังรูปที่ 2.6 วิถี ketoadipate คือ หนึ่งในวิถีหลักของการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบที่เป็นอะโรมาติก ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียที่อาศัยในดินและต้องการอากาศในการเจริญเติบโต วิธียังกล่าวเชื่อมโยงกับวิถีการสังเคราะห์ protocatechuate และแคทีคอล ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Harwood และ Parales, 1996) เอนไซม์ทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดซิสซิมิวโคนิกได้รับมาจากยีนของจุลินทรีย์ในจีนัสต่างๆ เช่น *Pseudomonas* *Acinetobacter* *Rhodococcus* และ *Burkholderia* เป็นต้น (Polen และคณะ, 2013)

Polen และคณะ (2013) พบว่าภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เบนโซเอตสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดซีสซิมวโคนิค โดยผ่านสารตัวกลาง 2 ชนิด คือ *Cis*-1,2-dihydroxybenzoate หรือ protocatechuate โดยแคทีคอลลีอว่าเป็นสารสำคัญในการผลิตกรดซีสซิมวโคนิค โดยอาศัยเอนไซม์ Catechol 1,2-dioxygenase ต่อมากรดซีสซิมวโคนิคถูกเปลี่ยนไปเป็นมิวโคโนแลคโตน โดยอาศัยเอนไซม์ Muconate cycloisomerase สุดท้ายมิวโคโนแลคโตน เข้าสู่วิถี β -ketoadipate เพื่อเปลี่ยนไปเป็นซัคซินิลโคเอ และอะซิติลโคเอ ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์กรดซีสซิมวโคนิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เบนโซเอตที่ใช้เป็นสารตั้งต้น

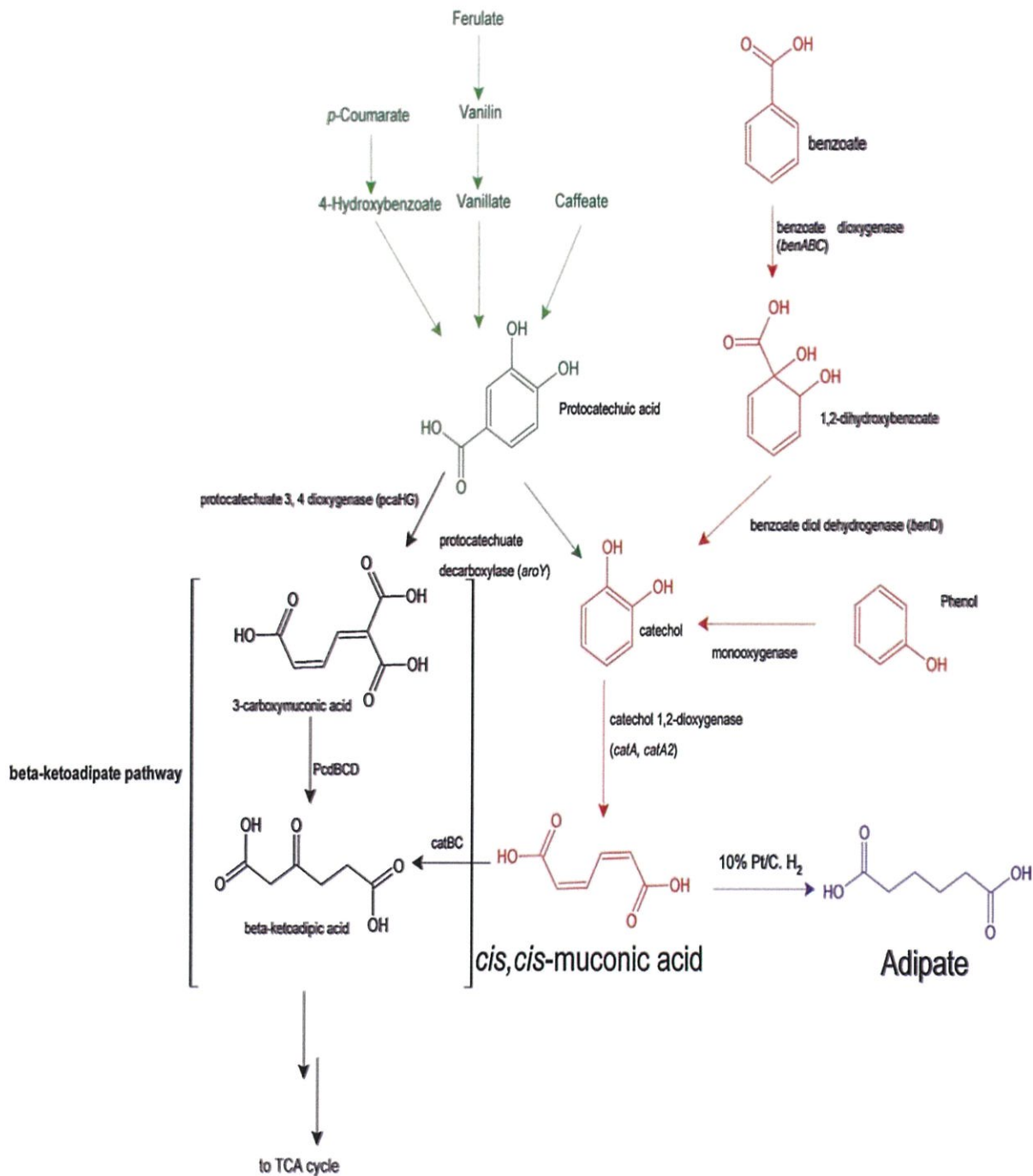
ที่มา : Polen และคณะ (2013)

นอกจากนี้ Polen และคณะ (2013) ยังพบว่าเบนโซเอตที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดซีสซิมวโคนิคนั้น เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตปิโตรเลียม ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาสกัดและใช้แล้วหมดไปได้ ดังนั้นสารตั้งต้นที่ได้จากกระบวนการชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ผลิตกรดซีสซิมวโคนิค โดยอาจใช้เบนโซเอตหรือสารประกอบอะโรมาติก เช่น ฟีนอล แคทีคอล กรด Protocatechuic และกรด 4-hydroxybenzoic เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ได้มาจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส จุลินทรีย์ สิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอติก และสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอติก

2.3.3 การสังเคราะห์กรดซีสซิมิวโคนิคจากสารอะโรมาติกที่สกัดได้จากลิกนิน

ลิกนินมีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก พบประมาณร้อยละ 40 ของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสมีมูลค่าที่สูงเมื่อเทียบกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส แต่ในปัจจุบันพบว่ายังมีการใช้ประโยชน์จากลิกนินน้อย (Erdocia และคณะ, 2014) จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายลิกนิน โดยการเปลี่ยนลิกนินไปเป็นสารอะโรมาติก อาศัยปฏิกิริยาดีโพลีเมอไรเซชัน (depolymerization) ทำให้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากอะโรมาติกที่พบในลิกนินได้รับความสนใจอย่างยิ่ง ซึ่งอะโรมาติกดังกล่าว คือ สารจำพวกฟีนอล (Phenol) โดยเปลี่ยนฟีนอลไปเป็น catechol โดยอาศัยเอนไซม์ monooxygenase (Fuchs และคณะ, 2011) และ catechol สามารถสลายกลายเป็นซีสซิมิวโคนิค โดยใช้เอนไซม์ catechol-1,2-dioxygenase (Draths และ Frost, 1994) จากนั้นกรดซีสซิมิวโคนิคถูกเปลี่ยนเป็น succinyl-CoA และ acetyl-CoA ตามลำดับ ผ่านทางวิถี ketoadipate (Polen และคณะ, 2014) หรือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะดิพิค โดยการเร่งปฏิกิริยาเคมี ดังรูปที่ 2.7

protocatechuate เป็นสารตัวกลางที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น catechol ได้โดยอาศัยเอนไซม์ protocatechuate decarboxylase ที่สังเคราะห์จากยีน *aroY* ในพลาสมิด pKD 8.292 (Fuchs และคณะ, 2011) protocatechuate ถูกสังเคราะห์จากกระบวนการทางชีวภาพ โดยสารประกอบอะโรมาติกของลิกนิน เช่น coniferyl alcohol และ *p*-coumarate (Vardon และ คณะ, 2015) โดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440 สามารถสลายลิกนินไปเป็นสารประกอบอะโรมาติก และมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ตรึงเครียดได้ (Jimenez และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า การสังเคราะห์กรดซีสซิมิวโคนิค สามารถสังเคราะห์ได้จากการใช้เบนโซเอทเป็นสารตั้งต้นโดย Jeffrey และคณะ (1992) พบว่าเชื้อ *P. putida* สายพันธุ์ KT2440 มีการผลิตซีสซิมิวโคนิคจากเบนโซเอทซึ่งอาศัยเอนไซม์จาก 2 โอเปอรอน คือ *benABCD* และ *catBCA*



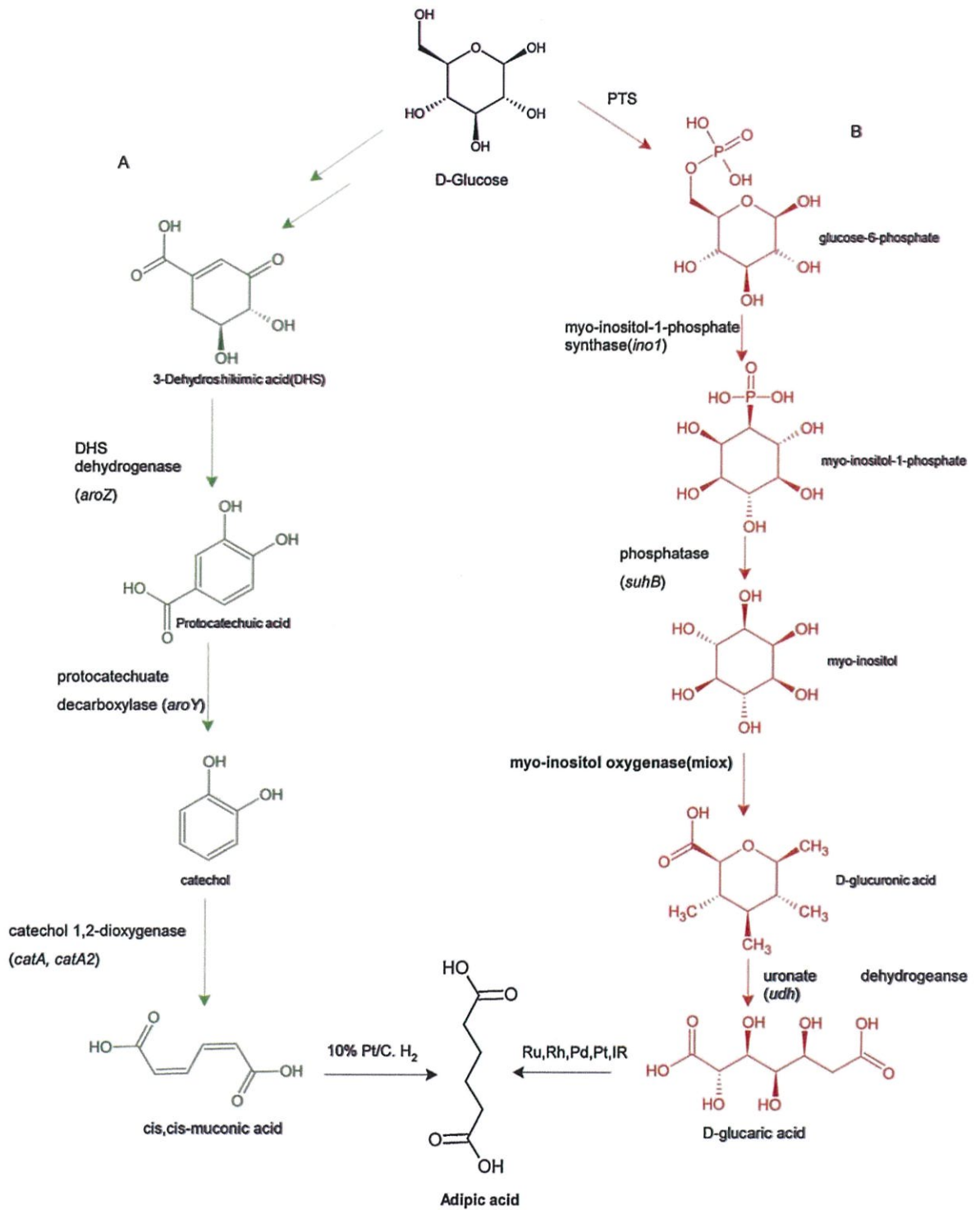
รูปที่ 2.7 การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ โดยอาศัยสารประกอบอะโรมาติกของลิกนิน
ที่มา : Yu และคณะ (2015)

2.3.4 การสังเคราะห์กรดกลูคาร์ริก (Glucaric acid) จากกลูโคส

การสังเคราะห์กรดอะดิพิค โดยอาศัยกลูโคสเป็นสารตั้งต้น ทำได้โดยการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นสารตัวกลางที่สำคัญ 2 ชนิด คือ กรดกลูคาร์ริก และกรดซิสซิมิวโคนิก ดังรูปที่ 2.8 กระบวนการพลังงานประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานว่าการกรดกลูคาร์ริกเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าสูง และสามารถสังเคราะห์ได้จากชีวมวล (Petersen และ Werpy, 2004) กระบวนการสังเคราะห์กรดกลูคาร์ริกทางชีวภาพ โดยอาศัยจุลินทรีย์ธัญไรรายงานโดย Prather และคณะ (2009) แห่งมหาวิทยาลัย MIT ซึ่งอาศัยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์กลาย พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์กรดกลูคาร์ริกโดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น ในวิธีการสังเคราะห์ประกอบไปด้วยขั้นตอนมากกว่า 10 ขั้นตอน ซึ่งยากต่อการนำไปใช้งาน ดังนั้น Prather และคณะ (2009) ได้สร้างวิธีการสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดกลูคาร์ริกในเชื้อ *E. coli* ดังแสดงในรูปที่ 2.8 (B) ซึ่งประกอบด้วยระบบ phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase (PTS) ซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยยีน *Ino1* ที่พบใน *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตเอนไซม์ Myo-inositol-1-phosphate synthase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถกำจัดหมู่ฟอสเฟต ออกจาก Myo-inositol-1-phosphate จากนั้นยีน *MIOX* ในหนู (Matsuhisa และคณะ, 1995) ซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ Myo-inositol oxygenase ทำหน้าที่เปลี่ยน Glucose-6-phosphate ไปเป็น Myo-inositol และกรดกลูคูโรนิก ตามลำดับ

นอกจากนี้ Prather และคณะ (2009) ได้ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการคัดลอกพลาสมิด เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *Ino1* และ *MIOX* และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง โดยการเติม IPTG พบว่าการกรดกลูคาร์ริกความเข้มข้นมากกว่า 1 กรัมต่อลิตรถูกผลิตขึ้น นอกจากนี้พวกเขายังค้นพบปัญหาของการผลิตกรดกลูคาร์ริก คือ สายพันธุ์ผสมของยีน *MIOX* ไม่มีความเสถียรและความสามารถในการทำงานขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Myo-inositol (Arner และคณะ, 2004; Moon และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น สามารถแก้ไขได้โดยการใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ (Shiue และ Prather, 2014) จากการศึกษาเรื่องความสามารถของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ Myo-inositol-1-phosphate synthase เอนไซม์ Myo-inositol oxygenase และเอนไซม์ Urate dehydrogenase เมื่อนำเอนไซม์ทั้งสามชนิดรวมเข้าไว้ด้วยกัน ส่งผลทำให้ความสามารถของยีน *MIOX* เพิ่มขึ้น และทำให้การผลิตกรดกลูคาร์ริกมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการสังเคราะห์กรดกลูคาร์ริกมีความเข้มข้นสูงถึง 12 มิลลิโมลาร์ (Moon และคณะ, 2010)

อย่างไรก็ตาม จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนกรดกลูคาร์ริกไปเป็นกรดอะดิพิคนั้น พบว่าการสังเคราะห์ทางเคมีได้รับความนิยมในการศึกษามากกว่าการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เนื่องจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี (Shiue และ Prather, 2014)



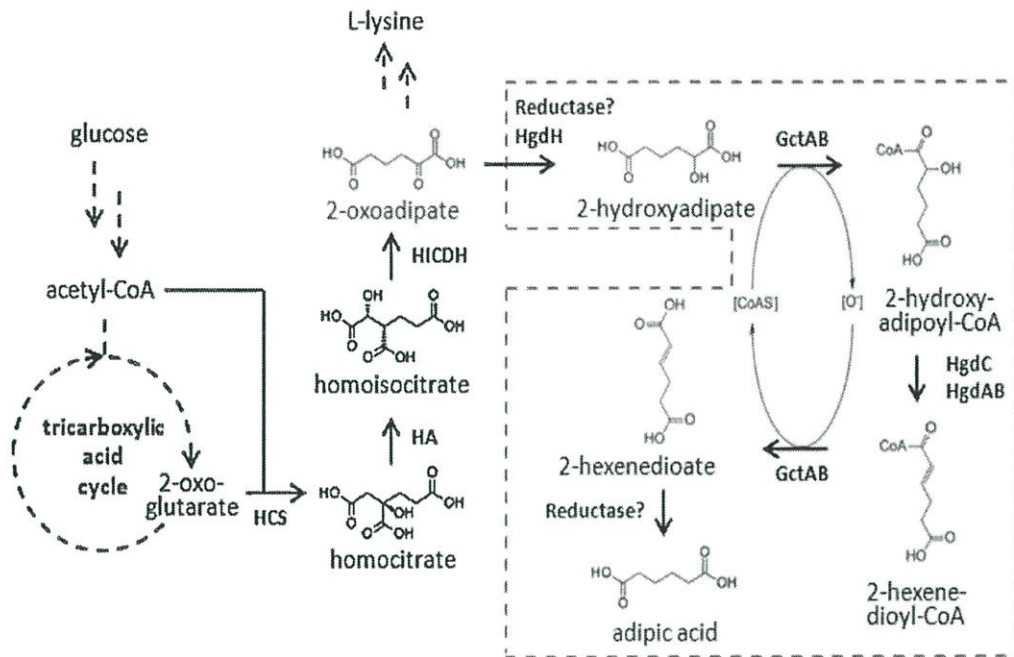
รูปที่ 2.8 (A) วิธีการสังเคราะห์กรดอะดิคติกทางชีวภาพ โดยอาศัยกรดซีสซิมิวโคนิก

(B) วิธีการสังเคราะห์กรดอะดิคติกทางชีวภาพ โดยอาศัยกรดกลูคาร์ริก

ที่มา : Yu และคณะ (2015)

2.3.5 การสังเคราะห์กรดอะมิโนจากกลูโคสผ่านทางวิถี α -aminoadipate

การสังเคราะห์ de novo ของกรดอะมิโนไลซีน ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากกรดแอสปาทิก โดยผ่านทางวิถีไดอะมิโนไพมาเลต (diaminopimelate pathway) สามารถพบได้ในพืช แบคทีเรีย และราชั้นต่ำ หรืออาจถูกสร้างขึ้นจาก 2-oxoglutarate ผ่านทางวิถี α -aminoadipate พบได้ใน ราชั้นสูง ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด (Kosuge และ Hoshino, 1999; Schmidt และคณะ, 1989; Xu และคณะ, 2006) ซึ่ง 2-oxoadipate เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตกรดอะมิโน พบว่า 2-oxoadipate สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโน โดยวิธี chemo-catalytic reduction หรือวิธีการใช้เอนไซม์ในเซลล์ *S. cerevisiae* ที่มีการตัดแต่งทางพันธุกรรม สำหรับวิถี α -aminoadipate ประกอบด้วย เอนไซม์ 8 ชนิดที่สำคัญ ซึ่งจะเปลี่ยน 2-oxoglutarate และอะซีติลโคเอเป็นกรดอะมิโน (Polen และคณะ, 2013) โดยขั้นตอนแรกนั้นเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ Homocitrate synthase (HCS) ทำหน้าที่เปลี่ยน 2-oxoglutarate ไปเป็น Homocitrate เอนไซม์ Homoaconitase (HA) ทำหน้าที่เปลี่ยน Homocitrate ไปเป็น Homoisocitrate และ เอนไซม์ Homoisocitrate dehydrogenase (HICDH) ทำหน้าที่เปลี่ยน Homoisocitrate ไปเป็น 2-oxoadipate นอกจากนี้พบว่า เอนไซม์ Homocitrate synthase (HCS) ถูกยับยั้งได้โดยกรดอะมิโน L-lysine ส่งผลให้ไม่มีการสังเคราะห์ 2-oxoadipate ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดอะมิโน และลดการเกิด aminoadipate (Polen และคณะ, 2013) จากนั้น 2-oxoadipate ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน โดยผ่านสารตัวกลางต่างๆ ได้แก่ 2-hydroxyadipate 2-hydroxyadipoyl-CoA และ 2-hexendioloyl-CoA ตามลำดับอาศัยเอนไซม์ 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase (HgdH) ทำหน้าที่เปลี่ยน 2-oxoadipate ไปเป็น 2-hydroxyadipoyl-CoA เป็น 2-hexendioloyl-CoA ซึ่งเอนไซม์ 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase (HgdH) ได้จากการสังเคราะห์กรดกลูตาโคนิกของ *Clostridium symbiosum* โดยใช้ 2-oxoglutarate เป็นสารตั้งต้น และมีโคเอร์แฟกเตอร์ทำปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.9 (Polen และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของกรดอะมิโน L-lysine ส่งผลต่อการสังเคราะห์ 2-oxoadipate ผ่านทางวิถี อะมิโนอะดิเพต (aminoadipate pathway) และเมื่อไม่นานมานี้พบว่ามีการประกอบบางชนิดที่พบใน *Thermus thermophilus* และ *S. cerevisiae* มีผลยับยั้งเอนไซม์ Homocitrate synthase อีกด้วย (Bulfer และคณะ, 2010; Okada และคณะ, 2009)

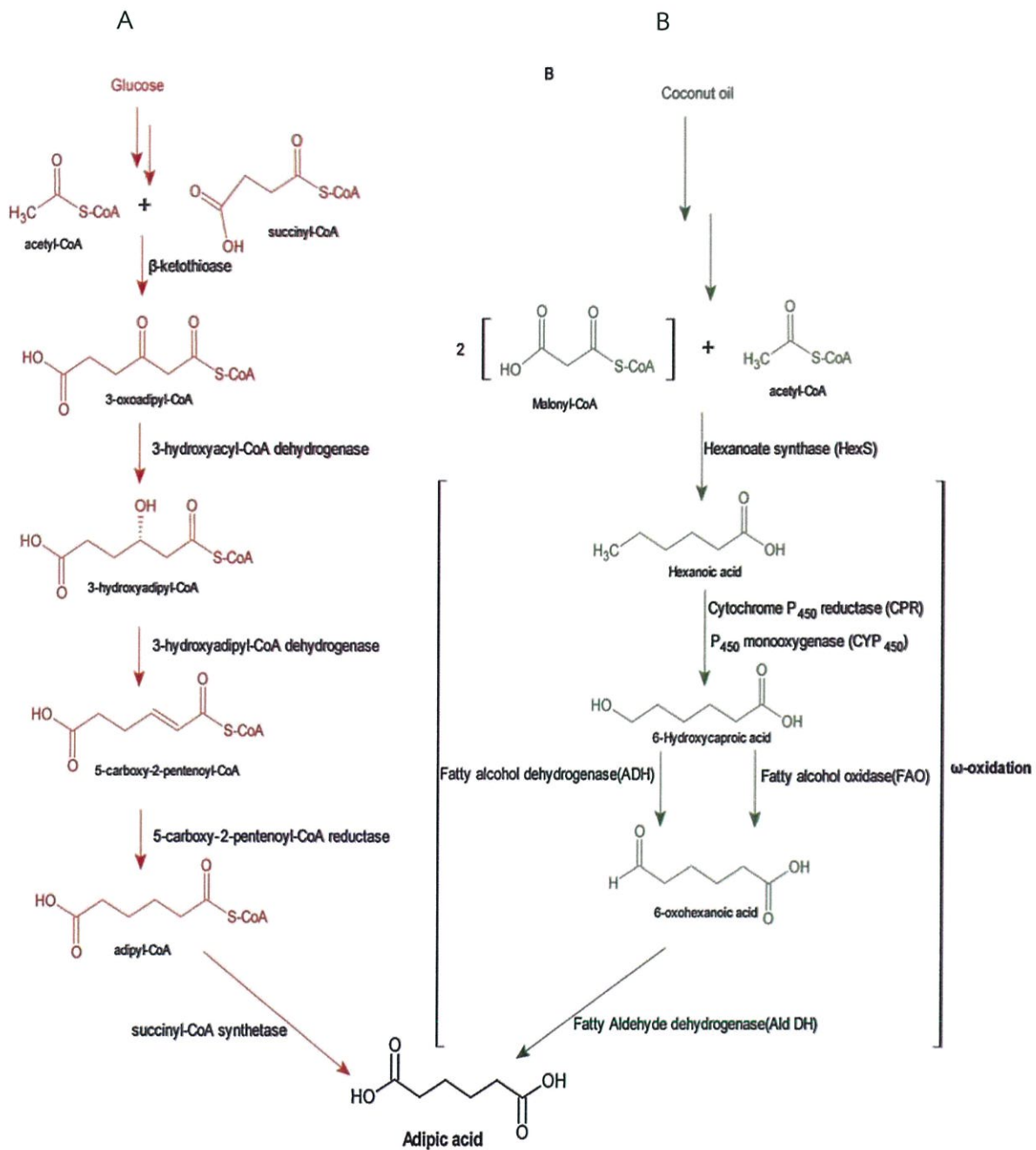


รูปที่ 2.9 กระบวนการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพผ่านวิถี α -aminoadipate โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

ที่มา : Polen และคณะ (2013)

2.3.6 การสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาว

จากการศึกษาข้างต้นสามารถสังเคราะห์กรดอะดิพิค โดยอาศัยกลูโคสเป็นสารตั้งต้น ดังรูปที่ 2.10 (A) นอกจากนี้การสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาว โดยอาศัยสัณฐานที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรม ด้วยวิถี α -oxidation และ ω -oxidation หรืออย่างใดอย่างหนึ่งของสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาว เช่น n-alkanes หรือกรดไขมัน เป็นต้น (Picataggio และ Beardslee, 2012) โดยกรดไขมันสายยาวสามารถเข้าสู่วิถี ω -oxidation โดยอาศัยเอนไซม์ hexanoate synthase (HexS) ที่พบในเชื้อ *Candida tropicalis* ซึ่งในขั้นตอนแรกของวิถี ω -oxidation นั้นจะผลิตกรด 6-hydroxycaproic ต่อมากกรด 6-hydroxycaproic ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรด 6-oxohexanoic โดยอาศัยเอนไซม์ fatty alcohol dehydrogenase (ADH) หรือเอนไซม์ fatty alcohol oxidase (FAO) จากนั้นกรด 6-oxohexanoic จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะดิพิคโดยอาศัยเอนไซม์ fatty aldehyde dehydrogenase (Ald DH ดังรูปที่ 2.10 (B)) (Polen และคณะ, 2013)



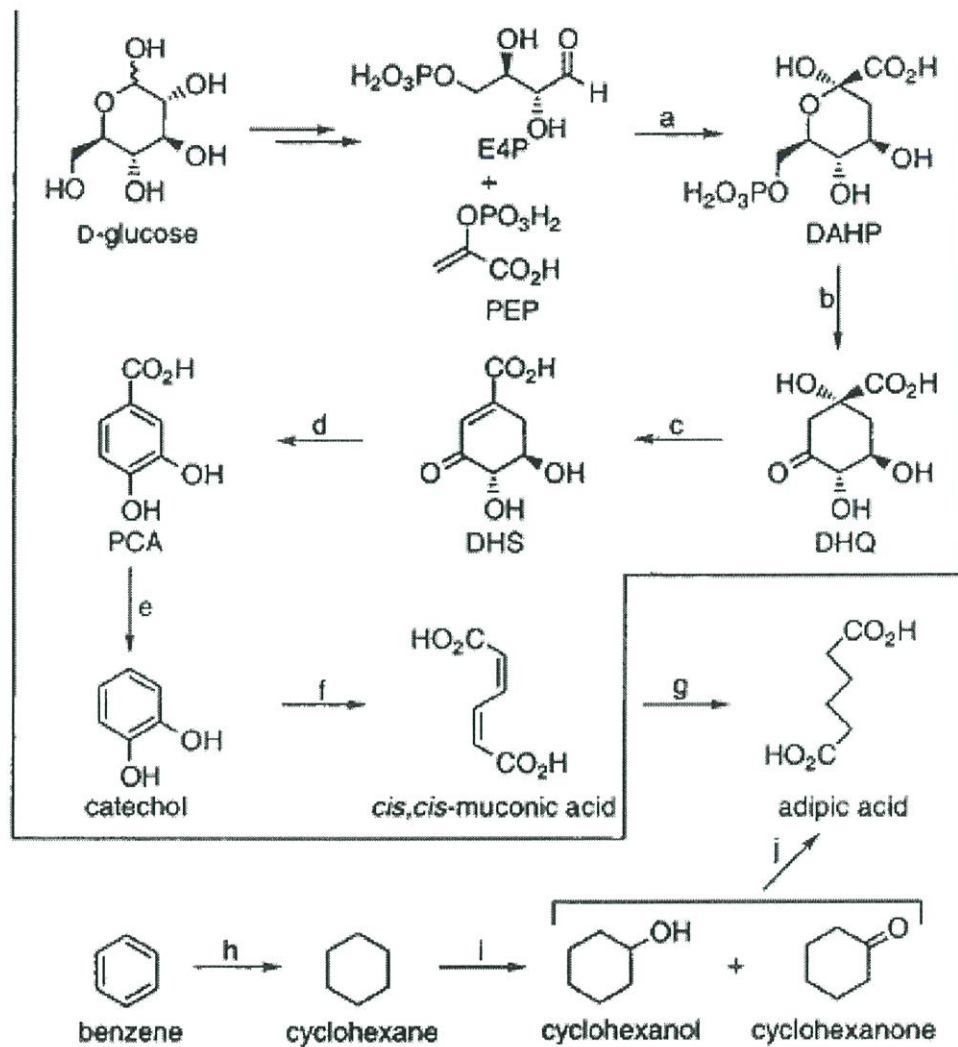
รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ โดยอาศัยสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาว
 (A) การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ โดยอาศัยกลูโคสเป็นสารตั้งต้น
 (B) การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ โดยอาศัยกรดไขมันเป็นสารตั้งต้น
 ที่มา : Yu และคณะ (2015)

2.4 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดอะดิพิค

จากงานวิจัยของ Wei และคณะ (2002) ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกของสายพันธุ์ *E. coli* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ Fed batch และกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) เพื่อเปลี่ยนกรดซิสซิมิวโคนิกไปเป็นกรดอะดิพิค ซึ่งเป็น dicarboxylic acid ที่สำคัญ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไนลอน 6,6 โพลีเอไมด์ เนื่องจากการสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะช่วยขจัดปัญหาด้านมลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่พบในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางเคมี โดยใช้เบนซีนเป็นสารตั้งต้น มีสารตัวกลางคือ ไฮโคเฮกเซน ไฮโคลเฮกซานอล และไฮโคลเฮกซาโนน (Davis และคณะ, 1991; Stadelhofer, 1988) ดังรูปที่ 2.11 และจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไนตริกกับสารผสมไฮ-โคลเฮกซานอล และไฮโคลเฮกซาโนน นอกจากจะได้กรดอะดิพิคเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ยังเกิดผลพลอยได้เป็นไนตรัสออกไซด์ ซึ่งส่งผลเสียไปทำลายชั้นบรรยากาศของโลกและก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (Dickinson และคณะ, 1986) ในปี 1991 พบว่าอุตสาหกรรมการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางเคมี ทำให้ระดับไนตรัสออกไซด์ในชั้นบรรยากาศเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 10 (Thiemens และ Trogler, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าเบนซีนเป็นสารก่อมะเร็ง (Lewis, 1991) ทั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอีลอยด์และมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอนฮอดจ์กิน (Connor และคณะ, 1999) และเบนซีนเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีราคาแพงและมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อยๆ (Stadelhofer, 1988; Szmant, 1989) ดังนั้นการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพผ่านวิธีการสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกจากกลูโคสจะผ่านสารตัวกลาง ได้แก่ กรด 3-ดีไฮโดรซิมิมิก กรดโปรโตแคทีคูอิก และแคทีคอล ดังรูปที่ 2.11 (Draths, 1994) โดยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของกรดซิสซิมิวโคนิกทำให้ได้กรดอะดิพิคจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ

ในงานวิจัยของ Wei และคณะ (2002) พบว่า *E. coli* WN1/pWN2.248 สามารถสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกได้ความเข้มข้น 36.8 กรัมต่อลิตร ได้ค่าผลได้ร้อยละ 20 (โมลต่อโมล) ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักแบบ Fed batch เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในการสังเคราะห์กรดซิสซิมิวโคนิกจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิดที่ไม่พบใน *E. coli* ได้แก่ ยีน *aroZ* ที่สร้างเอนไซม์ดีเอชเอสดีไฮดราเลส และยีน *aroY* ที่สร้างเอนไซม์โปรโตแคทีคูเอต ดีคาร์บอกซิเลส โดยยีนทั้งสองชนิดได้จาก *Klebsiella pneumonia* และยีน *catA* ที่สร้างเอนไซม์แคทีคอล 1,2 ไดออกซิจีเนสได้จาก *Acinetobacter calcoaceticus* หลังการเพาะเลี้ยงแบบ Fed batch ของ *E. coli* WN1/pWN2.248 เซลล์จะถูกกำจัดออกจากน้ำเลี้ยงและมีการเอาสารละลายโปรตีนออก จากนั้นเติมตัวเร่งปฏิกิริยา คือ แพลทตินัมร้อยละ 10 ในคาร์บอน ที่ 3400 kPa เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเปลี่ยนกรดซิสซิมิวโคนิกไปเป็นกรดอะดิพิค นอกจากนี้อัตราผลได้ของกรดซิสซิมิวโคนิกจากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และค่าผลได้ของกรดอะดิพิคจากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของกรดซิสซิมิวโคนิก ได้มีการวิเคราะห์ค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากการใช้กลูโคส โดยพบว่าค่าผลได้ร้อยละ 24 จากการสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากการใช้กลูโคสโดย *E. coli* WN1/pWN2.248 มีค่าผลได้จากการสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากกรดซิสซิมิวโคนิกร้อยละ 97 โดยกลูโคสมีราคา 0.13 เหรียญดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อกิโลกรัม และคาดว่ากรดอะดิพิคที่ผลิตจากกลูโคสจะขายได้ในราคา 2.46 เหรียญดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อกิโลกรัม แต่ในการสังเคราะห์จากเรซิน พบว่าราคาขายน้อยกว่าคือ 1.52 เหรียญดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อกิโลกรัม (Chemical Market Reporter, 2001) ดังนั้นการสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากสารตั้งต้นที่เป็นชีวมวล

ที่ทดแทนได้แทนการใช้ Fossil Fuel นอกจากจะไม่ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังมีแนวโน้มที่จะสังเคราะห์กรดซีสซิมวโคนิคได้ในระยะยาว โดยอาศัยจุลินทรีย์



รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์กรดอะดิคจากกลูโคสและเบนซีน
ที่มา : Wei และคณะ (2002)

2.5 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดิพิค

การสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ มีประมาณร้อยละ 20-30 ของการสังเคราะห์ทั้งหมด แม้ว่ากรดอะดิพิคมีราคาสูง และมีความพยายามในการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพที่มากขึ้น แต่ก็ยังไม่มีวิธีการผลิตที่เป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจ (Polen และคณะ, 2013 ; Kircher, 2006) อุปสรรคในการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพ คือ ยังไม่พบวิธีการสังเคราะห์แบบ Native-occurring Adipate ในจุลินทรีย์ แต่ความเติบโตที่รวดเร็วของวิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายสารทางชีวภาพ (Metabolic Engineering) ซึ่งมีวิธีการที่ทันสมัยมากขึ้นในการที่จะคัดเลือกและหาวิธีเมตาบอลิซึม และการบูรณาการวิธีต่างๆ เข้าไปในจุลินทรีย์ที่เป็นโฮสต์ (host) (Ajikumar และคณะ, 2010 ; Yom และคณะ, 2011) และมีความพยายามอย่างมากที่จะหาเอนไซม์จากในธรรมชาติที่อาจนำไปสู่การสังเคราะห์อะดิเพต (Adipate) ทางชีวภาพ ซึ่งจากการค้นคว้ารวบรวมข้อมูลของ Deng และคณะ (1999) เกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดิพิคได้พบ 2 วิธีในการสังเคราะห์กรดอะดิพิคทางชีวภาพคือ (1) การสังเคราะห์พีรีเคอเซอร์ เช่น กรดซิสซิมิโคนิกและกรดกลูคาริก แล้วถูกเร่งปฏิกิริยาไปเป็นกรดอะดิพิค (Niu และคณะ, 2002 ; She และคณะ, 2011 ; Thomas และคณะ, 2003) และ (2) การสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยตรงจากแหล่งคาร์บอน (Han และคณะ, 2013 ; Picataggio และคณะ, 2012 ; Yu และคณะ, 2014 ; Burgard และคณะ, 2011) เช่น การเปลี่ยนสารประกอบพอลิโนเซลลูโลส (lignocellulose) ไปเป็นกรดอะดิพิคได้โดยตรง เรียกว่าวิธีการนี้ว่า consolidated bioprocessing (CBP) ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดิพิคได้นั้นจะแสดงในตารางที่ 2.1

งานวิจัยของ Nui และคณะ (2002) พบว่า *E. coli* WN1/pWN2.248 สามารถสังเคราะห์กรดซิสซิมิโคนิกโดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นได้ 36.8 กรัมต่อลิตร โดยในการสังเคราะห์กรดซิสซิมิโคนิกจะมีความต้องการเอนไซม์ 3 ชนิดที่ไม่พบใน *E. coli* ได้แก่ ยีน *aroZ* ที่สร้างเอนไซม์ ดีเอชเอสตีไฮดราเทส และยีน *aroY* ที่สร้างเอนไซม์โปรโตเคทีคูเอท ดีคาร์บอกซิเลส โดยยีนทั้งสองชนิดได้มาจาก *Klebsiella pneumoniae* และยีน *catA* ที่สร้างเอนไซม์ แคทีคอล 1,2 ไดออกซิจีเนส ได้มาจาก *Acinetobacter calcoaceticus* จากนั้นกรดซิสซิมิโคนิกที่สังเคราะห์ได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยแพดทินัมร้อยละ 10 บนคาร์บอนและเปลี่ยนเป็นกรดอะดิพิคได้สูงถึง 36.7 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้กรดอะดิพิคยังสามารถสังเคราะห์ได้โดยยีสต์สายพันธุ์ที่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม โดยใช้สารตั้งต้นเป็นคาร์บอนสายยาว เช่น แอลเคนหรือกรดไขมัน ผ่านทางวิถี ω -oxidation หรือ α -oxidation (Picataggio และคณะ, 2012 ; Yang และคณะ, 2010 ; Smit และคณะ, 2005) โดยในยีสต์ *Candida tropicalis* กรดไขมันสายยาวจะเข้าสู่วิถี ω -oxidation ได้โดยมีเอนไซม์ Hexanoate synthase (HexS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในยีสต์ให้สังเคราะห์ Hexanoic acid และในวิถี ω -oxidation นั้น Hexanoic acid จะเปลี่ยนเป็น 6-hydroxycaproic acid โดยเอนไซม์ Cytochrome P450 hydroxylase complex ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ NADPH cytochrome P450 reductase (CYP) และ NADPH cytochrome P450 reductase (CRP) และ 6-hydroxycaproic acid จะเปลี่ยนไปเป็น 6-oxohexanoic acid โดยเอนไซม์ fatty alcohol dehydrogenase (ADH) หรือเอนไซม์ fatty alcohol oxidase (FAO) และจากนั้น 6-oxohexanoic acid จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะดิพิคโดยเอนไซม์ fatty aldehyde dehydrogenase (Ald DH) (Picataggio และคณะ, 2012 ; Craft และคณะ, 2003) จากงานวิจัยของ Picataggio และคณะ (2012) หลังจากการเพาะเลี้ยง *Candida tropicalis* sAA580 เป็นเวลา 6 วัน พบว่ามีการสังเคราะห์

กรดอะดิพิคจากน้ำมันมะพร้าว (Coconut oil) ได้มากกว่า 4 กรัมต่อลิตร จากนั้น Picataggio และคณะ (2012) ได้ทำการพัฒนายีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวให้สังเคราะห์กรดอะดิพิคได้สูงขึ้น 50 กรัมต่อลิตรในเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะดิพิค

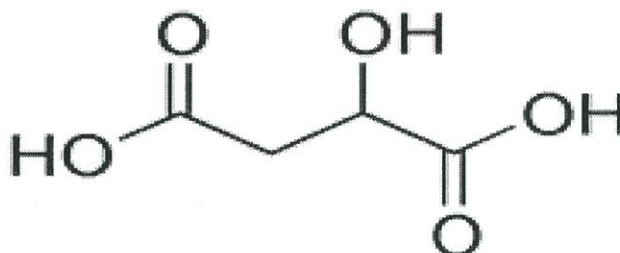
การสังเคราะห์กรดอะดิพิคจากพีรีเคอร์เซอร์				
จุลินทรีย์	ซับสเตรท	พีรีเคอร์เซอร์	ความเข้มข้นของกรดอะดิพิค	ที่มา
สายพันธุ์ที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม				
<i>E. coli</i> WN1/pWN2.248 (<i>aroZ/aroY/catA</i>)	Glucose, 167 g/L	cis,cis- muconic, 36.8 g/L	36.7 g/L	Niu และคณะ (2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MuA12 (<i>aroZ/aroY/catA</i>)	Glucose, 40 g/L	cis,cis- muconic, 0.141 g/L	NA	Curran และคณะ (2013)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440-CJ103 (<i>aroY/catA</i>)	<i>p</i> -Coumarate, unknown	cis,cis- muconic, 13.5 g/L	13.5 g/L	Vardon และคณะ (2015)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440-JD1 (<i>benABC/benD/catA</i>)	Glucose และ benozate, unknown	cis,cis- muconic, 18.5 g/L	NA	Van และคณะ (2012)
<i>E. coli</i> M2-2 (sgrS)	myo-Inositol, 10.8 g/L	D-glucaric acid, 4.85 g/L	NA	Shiue และคณะ (2014)
การสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยตรงจากซับสเตรท				
สายพันธุ์ดั้งเดิม				
<i>Arthrobacter</i> สายพันธุ์ BP2 / <i>Rhodococcus</i> สายพันธุ์ Phi2	Cyclohexanone, 1 g/L	NA	0.05 g/L	Brzostowicz และคณะ (2003)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะดิพิค (ต่อ)

การสังเคราะห์กรดอะดิพิคโดยตรงจากซัสเตรท				
สายพันธุ์ที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม				
<i>E. coli</i> QZ1111 (<i>paaJ/paaH1</i>)	Glucose, unknown	NA	0.0007 g/L	Yu และคณะ (2014)
<i>Candida tropicalis</i> sAA580 (<i>hexS/CPR/CYP450/ADH</i> <i>/FAO/Ald DH</i>)	Coconut oil, unknown	NA	50 g/L	Picataggio และ คณะ (2012)
<i>Thermobifida fusca</i> B6 (<i>adhE2</i>)	Glucose, 50 g/L	NA	2.23 g/L	Deng และ Mao (2015)

2.6 กรดมาลิก

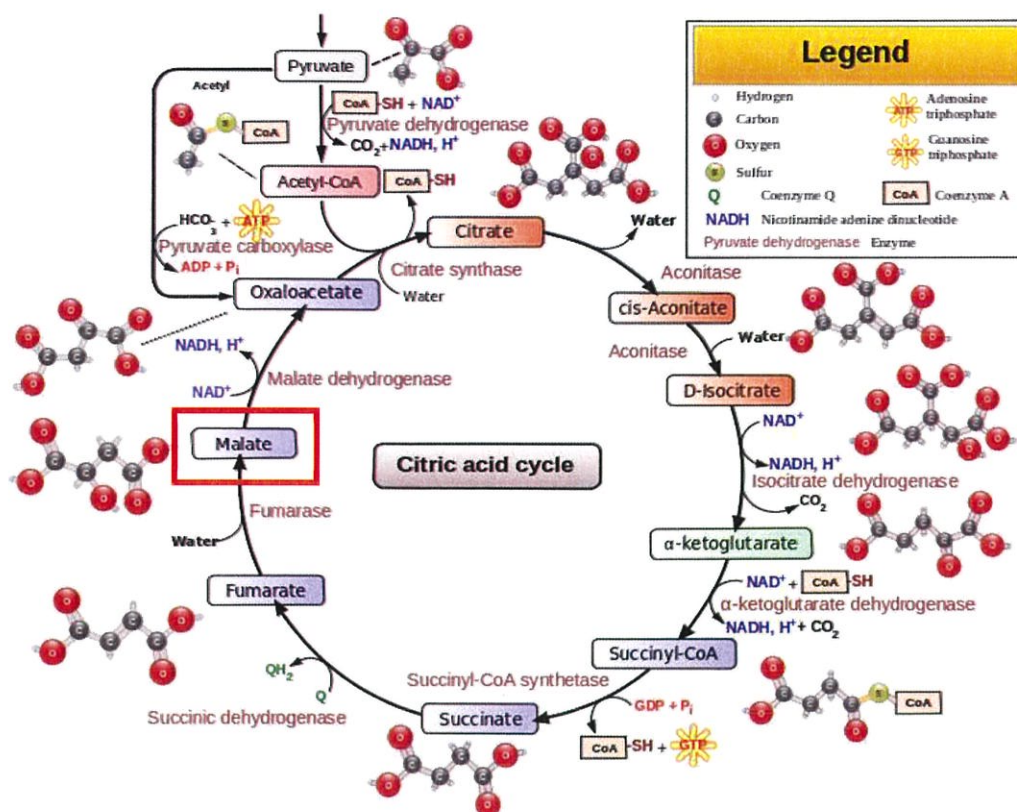
กรดมาลิก (malic acid) มีชื่อ IUPAC ว่า กรดไฮดรอกซิลบิวเทนไดโอดิก (hydroxyl-butane dioic acid) และมีชื่ออื่นๆ ได้แก่ L-Malic acid, D-Malic acid และ Hydroxysuccinic acid มีสูตรโมเลกุล คือ $C_4H_6O_5$ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.12 เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ประเภทคาร์บอกซิลิกที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ เชื่อมต่อกับคาร์บอน 4 อะตอม มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาว มีน้ำหนักโมเลกุล 134.09 กรัมต่อโมล จุดเดือด 150 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว 128 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ดีมาก ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2001)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของกรดมาลิก

ที่มา : http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m471117.html

กรดมาลิกสกัดได้ครั้งแรกจากน้ำแอปเปิ้ลโดย Carl Wilhelm Scheele ในปี ค.ศ. 1785 และได้ถูกเสนอชื่อว่า *acide malique* โดย Antoine Lavoisier ในปี ค.ศ. 1787 ซึ่งเป็นสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ เช่น แอปเปิ้ล เซอร์รี่ พลัม องุ่น และมะเขือเทศ เป็นต้น เป็นกรดที่ทำให้เกิดความเป็นเปรี้ยว และมีความคงอยู่ของรสชาติที่นานกว่ากรดซิตริก (Wang และคณะ, 1998) อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อและเป็นสารตัวกลางในวิถี Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ดังรูปที่ 2.13 และยังเป็นตัวกลางสำคัญในวิถี Succinate propionate pathway อีกด้วย (Chong และคณะ, 2014)



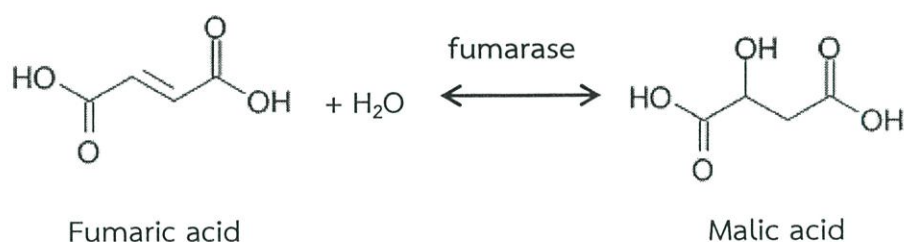
รูปที่ 2.13 วัฏจักรเครบส์

ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Citric_acid_cycle

ในทางอุตสาหกรรมกรดมาลิกได้ถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งกลิ่นอาหารและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพลีเมอร์ต่างๆ เช่น พลาสติก เส้นใย และยาง เป็นต้น อีกทั้งยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางทางด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดโลหะ และสารเคลือบอีกด้วย (Gok และคณะ, 2014) กรดมาลิกสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น การสกัดจากพืช เอนไซม์ และการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นต้น การสกัดจากพืช เช่น แอปเปิ้ล องุ่น และเชอร์รี่ เป็นต้น ถือเป็นวิธีการแบบดั้งเดิมสำหรับการสังเคราะห์กรดมาลิก ซึ่งวิธีนี้ทำให้ได้กรดมาลิกในปริมาณความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำจึงไม่นิยมใช้กันในปัจจุบัน (Wang และคณะ, 1998) นอกจากนี้กรดมาลิกยังสามารถสังเคราะห์ได้โดยการไฮเดรชัน (Hydration) ของกรดมาลิก (Maleic acid) หรือกรดฟูมาริก (Fumaric acid) ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพนี้ มีกระบวนการที่ละเอียดและซับซ้อน อีกทั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์นั้นมีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งทำให้ยากต่อการนำมาใช้งานได้จริงจึงได้มีการศึกษาการใช้กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งใช้รา *Aspergillus* และ *Schizophyllum commune* มาทดลองสังเคราะห์กรดมาลิก พบว่าสามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ แต่ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์กรดมาลิกนั้นมีค่าความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้น Moon และคณะ (2008) จึงได้ทำการพัฒนากระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิกให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์กลาย มาทำการสังเคราะห์กรดมาลิกแทน (Moon และคณะ, 2008)

2.7 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยกระบวนการทางเอนไซม์

โดยสังเคราะห์ผ่านกระบวนการ hydration ของกรดฟูมาริก ด้วยวิธีการตรึงเซลล์หรือการตรึงเอนไซม์ที่คัดแยกได้ (Peleg และคณะ, 1988) กรดฟูมาริกจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นกรดมาลิก โดยการเติมน้ำเข้าไปที่พันธะคู่และมีเอนไซม์ fumarase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Vasic และ Racki, 2005) ดังรูปที่ 2.14 ซึ่งเอนไซม์ fumarase (EC 4.2.1.2) เป็นเอนไซม์ที่พบมากในระบบของสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ พืชชั้นสูง และสัตว์ (Figueiredo และ Carvalho, 1991) นอกจากนี้ยังเป็นเอนไซม์ของวัฏจักรกรดซิตริกหรือวัฏจักร Tricarboxylic acid (TCA) ที่พบในไมโทคอนเดรียของเซลล์ยูคาริโอต และไซโทพลาซึมของเซลล์โพรคาริโอตและเซลล์ยูคาริโอต (Sacchettini และคณะ, 1986) ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้ด้วยความสามารถของกรดมาลิกประมาณร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Presecki และคณะ, 2007) ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ fumarase เป็นดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 กระบวนการทางเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์กรดมาลิก
ที่มา : Krull และคณะ (1991)

ในปี 1990 การสังเคราะห์กรดมาลิกจากกรดฟูมาริก โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ทำการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ถูกออกแบบมาเพื่อการสังเคราะห์เอนไซม์ fumarase ให้ได้มากเกิน จุลินทรีย์นี้มีประโยชน์ต่อการเพิ่มผลได้ของกรดมาลิก Peleg และคณะ (1990) ได้ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการโคลนยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ fumarase ในสายพันธุ์เดียวกันเข้าไปใน expression vector พบว่าสามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิกได้สูงถึงประมาณร้อยละ 88 ต่อมา Figueiredo และ Carvalho (1991) รายงานว่า เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกตรึงในแผ่นเจลอะครีเลตสามารถสังเคราะห์กรดมาลิกจากกรดฟูมาริกได้ โดยไม่มีผลพลอยได้อื่นๆเกิดขึ้น จากนั้น Neufeld และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายที่ถูกตรึง พบว่า สามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิกได้สูงถึงประมาณร้อยละ 87 ภายในเวลา 45 นาที โดยไม่มีกรดซัคซินิกเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้น (Presecki และคณะ, 2007) ต่อมา Wang และคณะ (1998) ศึกษาผลของความเข้มข้นของซับสเตรทและระยะเวลาของกระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิกโดยเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SHY2 พบว่า ปริมาณของกรดมาลิกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรท แสดงให้เห็นว่า กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพนี้ไม่ได้ถูกยับยั้งโดยซับสเตรท Rosenberg และคณะ (1999) พบว่า ค่าการทำงานของเอนไซม์ fumarase ในเซลล์ยีสต์จีนัส *Dipodascus* สูงกว่าที่พบในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อมีการเติม Triton X-305 ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อรักษาเซลล์ ทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ fumarase ในเซลล์ยีสต์จีนัส *Dipodascus* เพิ่มขึ้นถึง 100% (Presecki และคณะ, 2007)

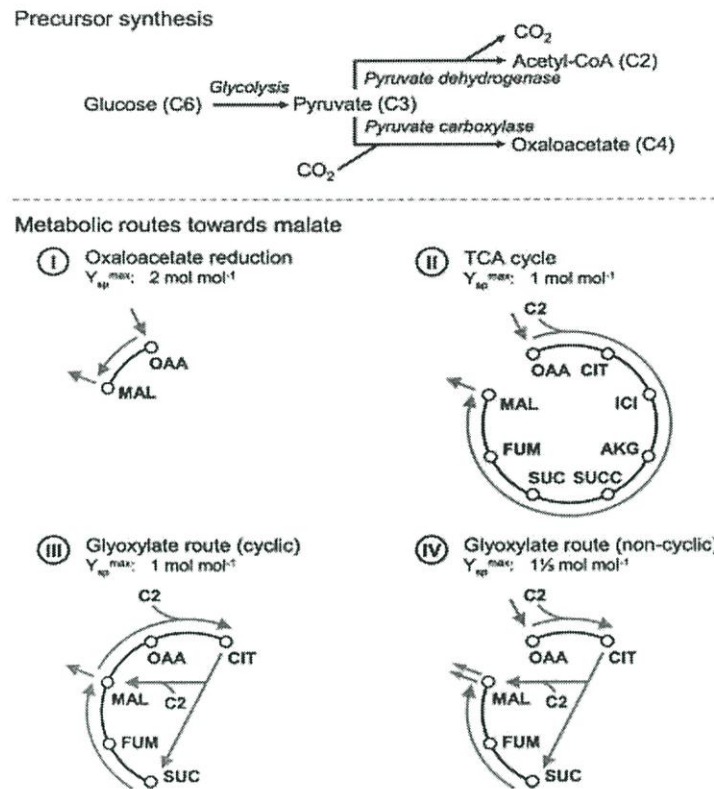
2.8 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการหมักของจุลินทรีย์

เนื่องจากในการสังเคราะห์ทางเคมี ซึบสเตอร์ที่ใช้ได้มาจากกระบวนการทางปิโตรเลียม ไม่ว่าจะเป็กรดมาเลอิก กรดฟูมาริก หรือ maleic anhydride ซึ่งส่งผลให้ราคาน้ำมันและก๊าซธรรมชาติเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสภาพภูมิอากาศและก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน เพื่อลดการเกิดปัญหาดังกล่าว จึงได้หันมาสนใจการสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการหมักของจุลินทรีย์ (Zhang และคณะ, 2011)

2.8.1 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยยีสต์

ในยีสต์ กรดมาลิกจะถูกสังเคราะห์ที่บริเวณไซโตซอลและไมโทคอนเดรีย ซึ่งเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกรดมาลิก จะมีผลต่อปริมาณการสังเคราะห์กรดมาลิก การแสดงออกของเอนไซม์ fumarase ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกซิเดชันในวัฏจักร TCA หรือเอนไซม์ malate dehydrogenase ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดักชันในวัฏจักร TCA บริเวณไมโทคอนเดรีย จะช่วยเพิ่มการสังเคราะห์กรดมาลิก นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ malate synthase ในวิถี glyoxylate เอนไซม์ pyruvate carboxylase ในกระบวนการรีดักชัน และเอนไซม์ malate dehydrogenase บริเวณไซโตซอล ยังช่วยเพิ่มการสังเคราะห์กรดมาลิกได้ด้วยเช่นกัน แต่การแสดงออกของเอนไซม์ malate dehydrogenase ซึ่งเป็นตัวเร่งในกระบวนการเปลี่ยนกรดมาลิกให้เป็นกรดไพรูวิกบริเวณไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดมาลิกลดลง ดังนั้นเพื่อให้การสังเคราะห์กรดมาลิกในยีสต์เป็นไปอย่างถูกต้อง จึงต้องมีการตรวจสอบกลไกของเอนไซม์ในขั้นแรกที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดมาลิกในยีสต์ด้วย (Nakayama และคณะ, 2012)

การสังเคราะห์กรดมาลิกในยีสต์ *S. cerevisiae* มี 4 วิธี ดังรูปที่ 2.15 ซึ่งประกอบด้วยวิถี Oxaloacetate reduction TCA cycle Glyoxylate route (cyclic) และ Glyoxylate route (non-cyclic) วิธีแรก คือ Oxaloacetate reduction เริ่มจากกระบวนการ carboxylation ของ pyruvate (ในยีสต์ *S. cerevisiae* ขาดเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxylase) ไปเป็น oxaloacetate ตามด้วยกระบวนการ reduction ของ oxaloacetate ไปเป็นกรดมาลิกซึ่ง pyruvate ที่สังเคราะห์ขึ้นในวัฏจักร glycolysis จะได้ ATP เป็นสารตัวกลาง ซึ่งเกิดจากการตรึง CO₂ ทำให้ผลได้ทางทฤษฎีสูงสุดของกรดมาลิกเป็น 2 โมลต่อกลูโคส 1 โมล วิธีที่สอง คือ TCA cycle เป็นกระบวนการ condensation ของ oxaloacetate และ acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) ไปเป็นกรดซิตริก ตามด้วยกระบวนการ oxidation ไปเป็นกรดมาลิก ผ่านวัฏจักร TCA ถ้า acetyl-CoA ถูกสังเคราะห์โดย pyruvate dehydrogenase และ oxaloacetate ถูกสังเคราะห์โดย pyruvate carboxylase กลูโคสจะเปลี่ยนเป็นกรดมาลิก โดยผ่านกระบวนการ oxidation ทำให้เกิดการปล่อย CO₂ ออกมา 2 ตัว ดังนั้น ผลได้ทางทฤษฎีสูงสุดของกรดมาลิกเป็น 1 โมลต่อกลูโคส 1 โมล วิธีที่สาม คือ Glyoxylate route (cyclic) เป็นการสังเคราะห์กรดมาลิกจาก acetyl-CoA 2 โมเลกุล โดยกระบวนการ oxidation ผ่านวัฏจักร glyoxylate ทำให้ผลได้ทางทฤษฎีสูงสุดของกรดมาลิกเป็น 1 โมลต่อกลูโคส 1 โมล เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากกระบวนการ decarboxylation ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ acetyl-CoA จาก pyruvate วิธีที่สี่ คือ Glyoxylate route (non-cyclic) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ของวัฏจักร glyoxylate แต่ oxaloacetate จะถูกเติมโดยกระบวนการ carboxylation ของ pyruvate ทำให้ผลได้ทางทฤษฎีสูงสุดของกรดมาลิกเป็น 1/3 โมลต่อกลูโคส 1 โมล (Zelle และคณะ, 2008)



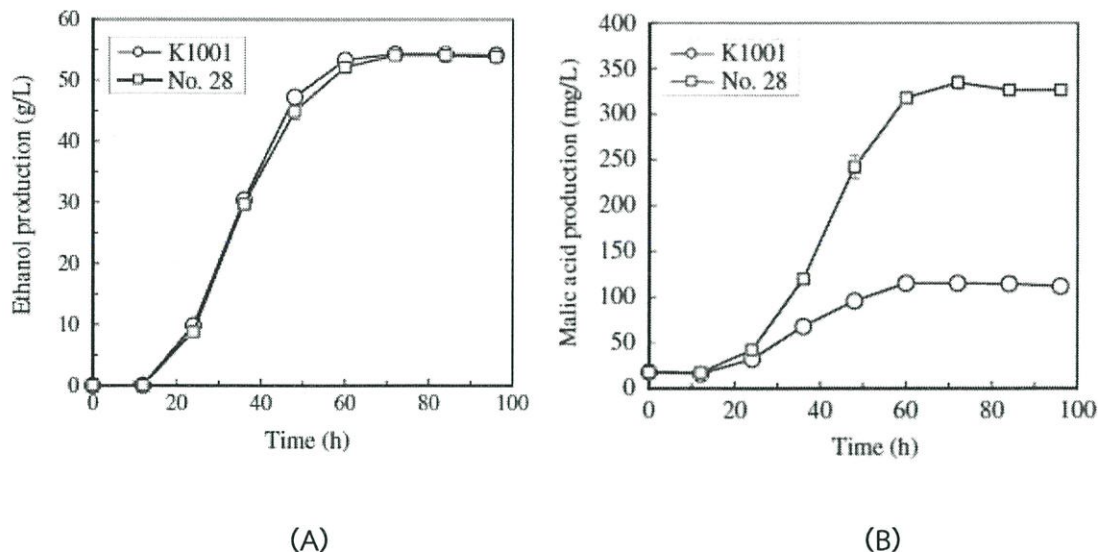
รูปที่ 2.15 การสังเคราะห์กรดมาลิกใน *S. cerevisiae* มี 4 วิธี โดยใช้ oxaloacetate และ/หรือ acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้น (I) กระบวนการ reduction ของ oxaloacetate (II) กระบวนการ Oxidation ของ citrate ผ่านวัฏจักร TCA (III) การสังเคราะห์จาก acetyl-CoA ผ่าน cyclic glyoxylate route (IV) การสังเคราะห์จาก acetyl-CoA และ oxaloacetate ผ่าน noncyclic glyoxylate route (OAA, oxaloacetate; MAL, malate; CIT, citrate; ICI, isocitrate; AKG, α -ketoglutarate; SUC, succinyl-CoA; SUC, succinate; FUM, fumarate; C2, acetyl-CoA; Y_{sp}^{max}, maximum theoretical yield (in mol malate per mol glucose)

ที่มา : Zelle และคณะ (2008)

2.8.1.1 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยยีสต์สาเก *Saccharomyces cerevisiae*

สายพันธุ์ No. 28

Nakayama และคณะ (2012) ศึกษาการสังเคราะห์กรดมาลิกและเอทานอลในยีสต์สาเก *S. cerevisiae* โดยเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ K1001 กับ No.28 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร yeast malt (YM) ที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณการสังเคราะห์เอทานอลและการเจริญเติบโต (growth curves) ที่คล้ายคลึงกัน ดังรูปที่ 2.16A และหลังจาก 24 ชั่วโมง สายพันธุ์ No.28 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ถึง 326 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ K1001 ถึง 2.9 เท่า ที่สังเคราะห์กรดมาลิกได้เพียง 111 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 2.16B จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เมตาบอลิซึมของยีสต์สายพันธุ์เหล่านี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันที่การสังเคราะห์กรดมาลิกเท่านั้น ดังนั้น ค่าการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกรดมาลิกในยีสต์เหล่านี้ จึงได้ถูกนำมาเปรียบเทียบในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 2.16 (A) การสังเคราะห์เอทานอล (B) การสังเคราะห์กรดมาลิก โดยยีสต์สาย S. cerevisiae สายพันธุ์ K1001 กับ No.28
 ○ สายพันธุ์ K1001 □ สายพันธุ์ No.28
 ที่มา : Nakayama และคณะ (2012)

ต่อมาทำการศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์กรดมาลิก ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ K1001 กับ No.28 โดยนำ crude enzyme ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบสภาวะคงที่ในอาหาร YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อกรดมาลิกถูกกระตุ้น (active) จะได้ค่าการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 7 ซึ่ง เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ K1001 กับ No.28 ดังตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่า ค่าการทำงานของ เอนไซม์ malate synthase ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในวิถี Glyoxylate จะต่ำที่สุดและไม่แตกต่างกัน ระหว่างสองสายพันธุ์ ส่วนค่าการทำงานของเอนไซม์ fumarase ของสายพันธุ์ No.28 จะไม่แตกต่าง กันมากกับสายพันธุ์ K1001 และค่าการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase จะต่ำในทั้ง สองสายพันธุ์ จากผลการศึกษาดังกล่าว จะเห็นได้ว่ากรดมาลิกไม่ได้สังเคราะห์ผ่านกระบวนการออกซิ เดชันของวัฏจักร TCA หรือวิถี Glyoxylate ในสายพันธุ์ No.28 แต่จะสังเกตได้ว่าค่าการทำงานของ เอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของกรดมาลิกในสายพันธุ์ No.28 จะสูงกว่าสายพันธุ์ K1001 ถึง 1.5 เท่า ดังนั้น ค่าการทำงานของเอนไซม์ malate dehydrogenase จึงมีส่วนน้อยมากต่อการ สังเคราะห์กรดมาลิกที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในสายพันธุ์ No.28 แม้ว่า ค่าการทำงานของเอนไซม์ malate dehydrogenase ในสายพันธุ์ No.28 จะสูงกว่าสายพันธุ์ K1001 เพียง 1.2 เท่า แต่ปริมาณ กรดมาลิกไม่น่าจะต่างกันเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในสายพันธุ์ No.28 มีการสังเคราะห์กรดมาลิก ได้ปริมาณสูง จากการรายงานของ Zelle และคณะ (2008) พบว่า การแสดงออกของยีน malate dehydrogenase ส่งผลให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ malate dehydrogenase ระหว่างสองสาย พันธุ์แตกต่างกันถึง 10 เท่า แต่ในส่วนของการสังเคราะห์กรดมาลิกจะแตกต่างกันเพียง 3 เท่า จากผล การรายงานดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า นอกจากค่าการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกที่มี ส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดมาลิกได้สูงในสายพันธุ์ No.28

ตารางที่ 2.2 ค่าการทำงานของเอนไซม์ (mU/mg) ระหว่างสายพันธุ์ K1001 กับ No.28 ที่มีส่วนร่วมในเมตาบอลิซึมของกรดมาลิก

	No. 28	K1001
Malate dehydrogenase	1398.0 ± 46.0	1192.5 ± 50.5*
Pyruvate carboxylase	880.8 ± 15.7	763.3 ± 41.6
Fumarase	557.4 ± 77.1	759.9 ± 61.1
Citrate synthase	211.5 ± 6.9	157.7 ± 9.5*
Malic enzyme	30.2 ± 3.1	21.4 ± 2.8*
Succinate dehydrogenase	6.4 ± 2.0	4.9 ± 0.6
Malate synthase	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1

ที่มา : Nakayama และคณะ (2012)

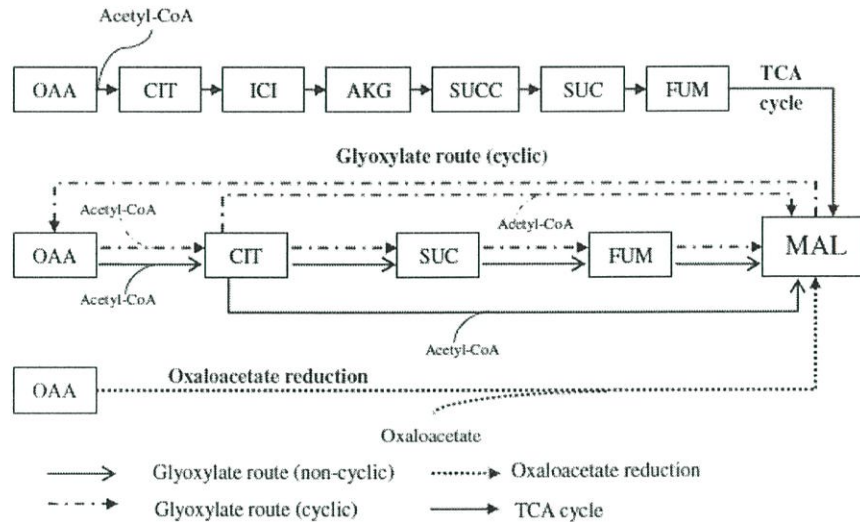
2.8.1.2 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยยีสต์สายพันธุ์ไวน์

Kishimoto และ Goto (1995) ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิในการหมักที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดมาลิกในยีสต์ *S. bayanus* กับ *S. cerevisiae* พบว่า การหมักยีสต์ *S. bayanus* ที่อุณหภูมิต่ำ 7 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดมาลิกได้สูงกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ถึง 1.5-4.5 เท่า (Kishimoto และ Goto, 1995) และสามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริกไปเป็นกรดมาลิกได้เนื่องจากมีค่าการทำงานของเอนไซม์ fumarase สูง (Presecki และ Vasic-Racki, 2005) และเมื่อเซลล์ยีสต์ *S. bayanus* ถูก permeabilized ด้วย Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ fumarase สูงขึ้นด้วย (Presecki และ Vasic-Racki, 2005) สำหรับในไวน์ที่ดื่มแล้ว *S. bayanus* จะสังเคราะห์กรดอะซิติกและเอทานอลได้น้อยมาก แต่จะสังเคราะห์กลีเซอรอล กรดซัคซินิก และกรดมาลิกได้สูงเนื่องจากไวน์ที่ดื่มแล้ว จะมีผลต่อการสลายตัวของสารประกอบในน้ำองุ่น (Schuller, 2010)

Rainieri และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces* sp. พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อเมตาบอลิซึมของกรดมาลิก โดยยีสต์สายพันธุ์ Cryotolerant เช่น *S. bayanus* และ *S. pastorianus* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส จึงมีประโยชน์ต่อการสังเคราะห์กรดมาลิก เนื่องจากการสังเคราะห์กรดมาลิกที่ดีจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 6-30 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ thermotolerant เช่น *S. cerevisiae* และ *S. paradoxus* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่ต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส จึงมีผลต่อการสลายตัวของกรดมาลิกในน้ำองุ่น (Jing และคณะ, 2014)

Fleet (2008) ได้อธิบายเกี่ยวกับเกณฑ์ที่จำเป็นสำหรับการคัดเลือกและการพัฒนาสายพันธุ์ไวน์สายพันธุ์ใหม่ว่า โดยทั่วไปยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wild type สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณต่ำประมาณ 0.3-2 กรัมต่อลิตร (Fatichenti และคณะ, 1984; Schwartz และ Radler, 1988; Yeramian และคณะ, 2007) เมื่อทำการปรับสภาวะการหมัก เช่น การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างสูง (pH 5.0) ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ความเข้มข้นของซัสเตรทต่ำ และความเข้มข้นของ yeast-assimilable nitrogen (YAN) ต่ำ พบว่า จะช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์กรดมาลิก (Yeramian และคณะ, 2007) การสังเคราะห์กรดมาลิกในบางสายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นผลมาจากความเข้มข้นของ fumarate และ pyruvate (Yeramian และคณะ, 2007) บางสายพันธุ์ที่เป็น wild types เช่น *S. cerevisiae* สายพันธุ์ 43

(ATCC 42510) (Wang และคณะ, 1998) และยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ No. 28 (Nakayama และคณะ, 2012) สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้สูงถึง 0.55 และ 0.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Zelle และคณะ (2008) จึงได้สรุปการสังเคราะห์กรดมาลิกจากกลูโคสโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ไว้ 4 วิธี ดังรูปที่ 2.17 ซึ่งประกอบด้วยวิถี Glyoxylate route (non-cyclic) Glyoxylate route (cyclic) Oxaloacetate reduction และ TCA cycle (Jing และคณะ, 2014)



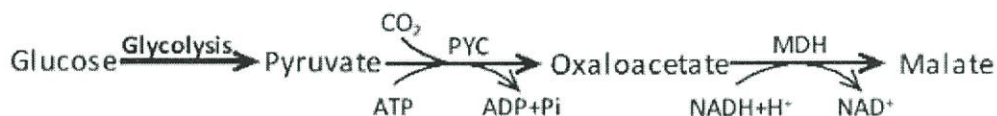
รูปที่ 2.17 วิธีการสังเคราะห์กรดมาลิกในยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ oxaloacetate และ/หรือ acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้น (OAA oxaloacetate, MAL malate, CIT citrate, ICI isocitrate, AKG α -ketoglutarate, SUCC succinyl-CoA, SUC succinate, FUM fumarate)

ที่มา : Jing และคณะ (2014)

นอกจากยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วยังมียีสต์สายพันธุ์อื่นๆอีกที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ เช่น *Kluyveromyces thermotolerans* (Kapsopoulou และคณะ, 2005, 2007) *Zygosaccharomyces rouxii* (Taing และ Taing, 2007) *S. uvarum* (Coloretti และคณะ, 2002) และ *S. bayanus* (Presecki และ Vasic-Racki 2005) โดย Taing และ Taing (2007) ได้ทำการคัดแยกยีสต์ *Z. rouxii* ที่ทนต่อน้ำตาลในอาหาร complex ที่ประกอบด้วยกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณสูงสุดถึง 75 กรัมต่อลิตร ต่อมางานวิจัยของ Coloretti และคณะ (2002) พบว่า ยีสต์ *S. uvarum* สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ โดยปริมาณของกรดมาลิกจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบในน้ำองุ่น แต่กลไกการสังเคราะห์กรดมาลิกใน *S. uvarum* ยังไม่ชัดเจนมากนัก ซึ่งยังพบว่าสายพันธุ์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* กับ *S. uvarum* สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณถึง 5 กรัมต่อลิตรด้วย (Jing และคณะ, 2014)

2.8.2 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยเชื้อรา

กรดมาลิก เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรกรดซิตริกหรือวัฏจักร TCA และสามารถสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์ทั่วไป เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราที่เป็นเส้นสาย ซึ่งมีเมตาบอลิซึมอยู่ 4 วิธี ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดมาลิกจากกลูโคส ประกอบด้วย วิธี Oxaloacetate reduction TCA cycle Glyoxylate route (cyclic) และ Glyoxylate route (non-cyclic) (Zelle และคณะ, 2008) แต่ถ้าพิจารณาถึงผลได้และความไม่ซับซ้อน วิธีที่เหมาะสม คือ วิธี reductive tricarboxylic acid (rTCA) จะอยู่บริเวณไซโตซอล ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่พบใน *Aspergillus* หลายสปีชีส์ เช่น *A. nidulans* *A. oryzae* และ *A. flavus* ที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ตามธรรมชาติ โดยจะเริ่มจากการสังเคราะห์ pyruvate ในวิธี glycolysis ผ่านกระบวนการ carboxylation โดยเอนไซม์ pyruvate carboxylase (PYC) จะเปลี่ยน pyruvate เป็น oxaloacetate ด้วยการตรึง CO_2 และใช้พลังงาน adenosine triphosphate (ATP) ตามด้วยกระบวนการ reduction โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH) จะเปลี่ยน oxaloacetate เป็น กรดมาลิก ควบคู่ไปกับการเปลี่ยน $\text{NADH}+\text{H}^+$ เป็น NAD^+ ดังรูปที่ 2.18 สรุปรวมจากกลูโคสจนถึงกรดมาลิก จะได้ ATP เป็นสารตัวกลาง ที่เกิดจากการตรึง CO_2 1 โมล ต่อ กรดมาลิก 1 โมล ส่วนผลได้ทางทฤษฎีสูงสุด คือ กรดมาลิก 2 โมล ต่อ กลูโคส 1 โมล (Brown และคณะ, 2013)

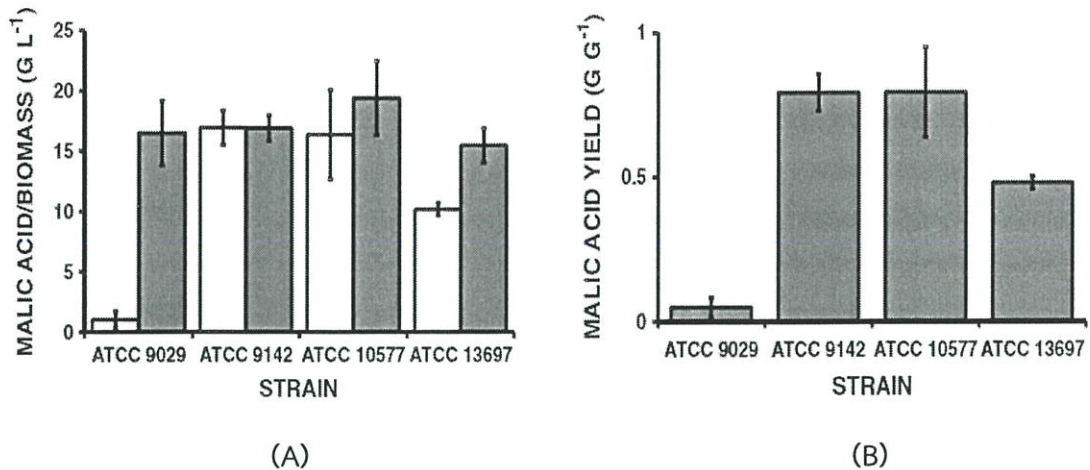


รูปที่ 2.18 การสังเคราะห์กรดมาลิกผ่านวิธี rTCA (PYC pyruvate carboxylase, MDH malate dehydrogenase)

ที่มา : Brown และคณะ (2013)

2.9.2.1 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. จากชังข้าวโพด (thin stillage)

West (2011) ได้ทำการศึกษาความสามารถของ *Aspergillus niger* โดยคัดเลือกสายพันธุ์ ATCC 9029, ATCC 9142 และ ATCC 10577 และ *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 มาสำหรับการสังเคราะห์กรดมาลิก โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยชังข้าวโพดเป็นขั้วสด เติร์ท และมีโพแทสเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสารปรับเสถียร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง พบว่า *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณสูงสุดถึง 17 กรัมต่อลิตร ส่วนการสังเคราะห์ชีวมวลจากชังข้าวโพดมีความคล้ายคลึงกันในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ ATCC 10577 สามารถสังเคราะห์ชีวมวลได้ปริมาณสูงสุดถึง 19 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 2.19A นอกจากนี้ *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 และ ATCC 10577 ให้ผลได้ของกรดมาลิกสูงสุดถึง 0.8 กรัมต่อกรัมของขั้วสด เติร์ท ดังรูปที่ 2.19B



รูปที่ 2.19 (A) การสังเคราะห์กรดมาลิกและชีวมวลโดย *Aspergillus* sp.

□ กรดมาลิก ■ ชีวมวล

(B) ผลได้ของกรดมาลิกโดย *Aspergillus* sp.

ที่มา : West (2011)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการตรวจสอบการสังเคราะห์กรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นสารปรับเสถียร พบว่า สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณถึง 36.4 กรัมต่อลิตร (Peleg และคณะ, 1988) ใน *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 กรดมาลิกสังเคราะห์ได้จาก pyruvate โดยมี oxaloacetate ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง (Peleg และคณะ, 1989) ส่วนเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดมาลิกใน *Aspergillus* sp. (Bercovitz และคณะ, 1990) ใน *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 เอนไซม์จะอยู่บริเวณไซโตซอล แต่ถ้าเป็น *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9029 ATCC 9142 และ ATCC 10577 เอนไซม์จะอยู่ทั้งบริเวณไมโทคอนเดรียและไซโตซอล (Bercovitz และคณะ, 1990) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 135 ชั่วโมง พบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณสูงกว่า *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9029 ATCC 9142 และ ATCC 10577 หลายเท่า (Bercovitz และคณะ, 1990) นอกจากนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวน (stirred fermentor) ขนาด 16 ลิตร ที่มีอาหารประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 190 ชั่วโมง พบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณถึง 113 กรัมต่อลิตร (Battat และคณะ, 1991)

ในการศึกษา West (2011) นี้ ความเข้มข้นของกรดมาลิกที่สังเคราะห์โดย *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 หรือ ATCC 10577 จากซังข้าวโพด จะสูงกว่า *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 ถึง 1.6 เท่า มีเพียง *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9029 เท่านั้นที่สังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณน้อยกว่า *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ ATCC 9142 หรือ ATCC 1057 สามารถใช้กลีเซอรอลที่อยู่ในซังข้าวโพดได้ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์กรดมาลิก

ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ผลได้ของกรดมาลิกที่สังเคราะห์โดยสายพันธุ์ ATCC 9142 หรือ ATCC 10577 จะสูงกว่าสายพันธุ์ ATCC 13697 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มีการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงๆ เป็นแหล่งคาร์บอนที่สถานะเหมาะสม พบว่า *A. niger* สามารถสังเคราะห์กรดซิตริกได้สูงกว่ากรดมาลิก (Bercovitz และคณะ, 1990) ใน *A. niger* การสะสมของกรดมาลิกจะค่อนข้างมากกว่ากรดซิตริก ซึ่งน่าจะเกิดจากปริมาณของกลีเซอรอล ไนโตรเจน และคาร์บอนในซังข้าวโพด ดังนั้น *A. flavus* ATCC 13697 อาจจะใช้กลีเซอรอลได้ช้ากว่า *A. niger* ส่งผลให้สังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณน้อย *A. niger* ซึ่งจะใช้กลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนเป็น glycerol/3-phosphate และ dihydroxyacetone phosphate (Salazar และคณะ, 2009) dihydroxyacetone phosphate อาจจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก และจะถูกเปลี่ยน โดยเอนไซม์ pyruvate carboxylase ไปเป็นกรดมาลิก หรือ เข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริกในรูปของกรดมาลิกโดยในซังข้าวโพดมีคาร์บอนอยู่ร้อยละ 9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อาจจะช่วยเพิ่มการสังเคราะห์กรดมาลิกโดยใช้เอนไซม์ pyruvate carboxylase ได้นอกจากนี้ *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 และ ATCC 10577 มีค่าการทำงานของเอนไซม์ NAD⁺ dependent malate dehydrogenase ในบริเวณไซโตซอลและไมโทคอนเดรียสูงกว่า *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 หรือ *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9029 (Bercovitz และคณะ, 1990) ค่าการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ที่สูงขึ้นในสายพันธุ์ ATCC 9142 หรือ ATCC 10577 อาจจะช่วยในการสังเคราะห์กรดมาลิกให้ได้สูงขึ้น เมื่อเทียบกับ *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 และแตกต่างจาก *A. flavus* กับ *A. niger* ที่สามารถสังเคราะห์กรดกลูโคนิกในกลูโคสได้สูง แต่ไม่สามารถสังเคราะห์ในกลีเซอรอลได้ อาจจะเป็นผลทำให้การสังเคราะห์กรดมาลิกได้สูงขึ้น (Bercovitz และคณะ, 1990) ผลได้ทางทฤษฎีจากกลีเซอรอล (กรดมาลิก 1 โมล ต่อ กลีเซอรอล 1 โมล) คาดว่าจะต่ำกว่าจากกลูโคส (กรดมาลิก 2 โมล ต่อ กลูโคส 1 โมล) ดังนั้นกลูโคสจึงเป็นซับสเตรทที่ต้องการเนื่องจากผลได้ทางทฤษฎีจากกลีเซอรอลต่ำกว่าจากกลูโคส และ *A. niger* ยังไม่ได้รับการรายงานว่ามีการผลิต aflatoxins เหมือนกับ *A. flavus* ATCC 13697 (Mislivec และคณะ, 1968)

โดยสรุปแล้ว กรดมาลิกถูกสังเคราะห์จากซังข้าวโพดโดย *Aspergillus* sp. จะเห็นได้ว่า *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้สูงที่สุด แต่ *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 10577 จะมีผลได้ของกรดมาลิกสูงสุดจากกลีเซอรอลในซังข้าวโพด กระบวนการที่ใช้น้ำตาลและกลีเซอรอลที่อยู่ในซังข้าวโพดมาสังเคราะห์กรดมาลิกโดย *A. niger* ซึ่งจะมีศักยภาพต่อการสังเคราะห์กรดมาลิกที่ใช้ผลิตเป็นอาหารได้ (food grade) (West, 2011)

2.9 แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดมาลิก

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ แหล่งของสารอาหาร ฟือเอช ออกซิเจน และอุณหภูมิ เป็นต้น โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำตาล และ กลีเซอรอล เป็นต้น ส่วนแหล่งไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน และ เกลือแอมโมเนียม เป็นต้น (Harrod และคณะ, 1997; Passos และคณะ, 2003)

ในระดับอุตสาหกรรม ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในสภาวะที่มีอากาศยีสต์จะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดี แต่ในสภาวะที่มีอากาศจำกัดจะทำให้ยีสต์เกิดการหมัก (Chomsri และคณะ, 2008) จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (1998) ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์กรดมาลิกของยีสต์ *S. cerevisiae* ATCC 42510 และ ATCC 42511 เลี้ยงในอาหาร YPD ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่แตกต่างกัน โดยในสภาวะที่มีอากาศทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 250 รอบต่อนาที ในขณะที่สภาวะไร้อากาศทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ปิดสนิทบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 80 รอบต่อนาที โดยใช้เวลาทั้งหมด 60 ชั่วโมงในการสังเคราะห์พบว่า *S. cerevisiae* ATCC 42510 และ ATCC 42511 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไร้อากาศ ได้สูงถึง 92.5 กรัมต่อลิตร และ 37.8 กรัมต่อลิตร (Wang และคณะ, 1998)

จากงานวิจัยของ West และคณะ (2011) ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์กรดมาลิกของ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ ATCC 9029 ATCC 9142 และ ATCC 10577 และ *A. flavus* สายพันธุ์ ATCC 13697 โดยใช้เอทานอลที่ได้จากซังข้าวโพดมาทำการสังเคราะห์กรดมาลิก ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยซังข้าวโพดเป็นซัสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 192 ชั่วโมง พบว่า *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ปริมาณสูงสุดถึง 17 กรัมต่อลิตร ส่วนการสังเคราะห์ชีวมวลจากซังข้าวโพดมีความคล้ายคลึงกันในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ ATCC 10577 สามารถสังเคราะห์ชีวมวลได้ปริมาณสูงสุดถึง 19 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *A. niger* สายพันธุ์ ATCC 9142 และ ATCC 10577 ยังให้ผลได้ของกรดมาลิกสูงสุดถึง 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งการสังเคราะห์กรดมาลิกทางชีวภาพโดยใช้กลูโคสจากธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอนจะช่วยลดปัญหาด้านมลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่พบในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์กรดมาลิกทางเคมีได้ (West และคณะ, 2011)

2.10 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิก

จากรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ พบว่าส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อนำมาใช้ในการสังเคราะห์กรดมาลิก ดังแสดงในตารางที่ 2.3

จากงานวิจัยของ Pines และคณะ (1997) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* DMM1-15A โดยใช้กาแลคโตสหรือกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในปริมาณจำกัด ที่พีเอช 5.5 เป็นเวลา 9 ชั่วโมง สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้สูงถึง 11.8 กรัมต่อลิตร (Pines และคณะ, 1997)

จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (1998) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ATCC 42510 และ ATCC 42511 ในอาหาร YPD ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในสถานะที่แตกต่างกัน โดยในสถานะที่มีอากาศทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 250 รอบต่อนาที ในขณะที่สภาวะไร้อากาศทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ปิดสนิทบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 80 รอบต่อนาที โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมง ในการสังเคราะห์ พบว่า *S. cerevisiae* ATCC 42510 และ ATCC 42511 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกในสถานะที่มีอากาศและสภาวะไร้อากาศ ปริมาณ 92.5 กรัมต่อลิตร และ 37.8 กรัมต่อลิตร (Wang และคณะ, 1998)

จากงานวิจัยของ Taing และคณะ (2007) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* V19 ในอาหาร YPG ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 140 ชั่วโมง สามารถสังเคราะห์ กรดมาลิกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 74.9 กรัมต่อลิตร (Taing และคณะ, 2007)

จากงานวิจัยของ West (2011) พบว่ารา *Aspergillus niger* ATCC 10577 สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้ 19 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร potato/dextrose broth ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 3.4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 192 ชั่วโมง (West, 2011)

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์กรดมาลิกได้

จุลินทรีย์	วิธีการสังเคราะห์	แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้นของกรดมาลิก	ที่มา
สายพันธุ์ที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม				
<i>S. cerevisiae</i> DMM1-15A (<i>leu2/ ura3/ ade2/ his5</i>)	ชีวมวล และเคมี	Galactose หรือ Glucose 20 g/L	11.8 g/L	Pines และ คณะ (1997)
สายพันธุ์ดั้งเดิม				
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 42510	ชีวมวล	Glucose, 20 g/L	92.5 g/L	Wang และ คณะ (1998)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 42511	ชีวมวล	Glucose, 20 g/L	37.8 g/L	Wang และ คณะ (1998)
<i>Zygosaccharomyces</i> <i>rouxii</i> V19	ชีวมวล	Glucose, 10 g/L	74.9 g/L	Taing และ คณะ (2007)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	ชีวมวล	Glucose, 3.4 g/L	17 g/L	West (2011)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10577	ชีวมวล	Glucose, 3.4 g/L	19 g/L	West (2011)

2.11 สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์กรดมาลิก

จากงานวิจัยของ Battat และคณะ (1990) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก โดย *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนขนาด 16 ลิตร ได้ทำการศึกษาปริมาณของสารอาหารที่แตกต่างกันและปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก ได้แก่ อัตราการกวน ความเข้มข้นของไนโตรเจน ไอออนโลหะ ความเข้มข้นของฟอสเฟต และความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต จากการศึกษาอัตราการกวนที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนโดยใช้อาหาร acid production medium ที่ประกอบด้วย กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 กรัมต่อลิตร (387 มิลลิกรัมต่อไนโตรเจน 1 ลิตร) PO_4^{3-} 6.5 มิลลิโมลาร์ อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีอัตราการกวนแตกต่างกัน 300-450 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เมื่อทำการตรวจสอบการผลิตกรดมาลิกที่อัตราการกวนต่างๆ ได้ผลการตรวจสอบการผลิตกรดมาลิกดังตารางที่ 2.4 พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที หลังการเพาะเลี้ยง 160 ชั่วโมง ร้อยละผลได้ของกรดมาลิกต่ำสุดเท่ากับ 51 โมลต่อโมลน้ำตาล และสามารถผลิตกรดมาลิกได้ความเข้มข้น 36 กรัมต่อลิตร และจากตารางที่ 2.4 พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนให้เพิ่มขึ้น ร้อยละผลได้ของกรดมาลิกจะสูงขึ้น เมื่อใช้อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที หลังการเพาะเลี้ยง 160 ชั่วโมง ร้อยละผลได้ของกรดมาลิกสูงสุดเท่ากับ 71 โมลต่อโมลน้ำตาล และสามารถผลิตกรดมาลิกได้ความเข้มข้น 39 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้การศึกษาสัณฐานวิทยาของ *A. flavus* สายพันธุ์ A114 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีอัตราการกวนเพิ่มขึ้น โดยพบว่าที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เซลล์จะมีลักษณะเป็น pellet ที่เกาะกันแน่น หากเพิ่มอัตราการกวนจะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของ pellet ลดลงและมีเส้นใยมากขึ้น

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ที่มีอัตราการกวนแตกต่างกัน

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคสที่ถูกใช้ (โมล)	ร้อยละผลได้ของกรดมาลิก (โมลต่อโมลน้ำตาล)
300	65	0.22	23
	160	0.54	51
350	65	0.25	41
	160	0.38	57
400	65	0.27	43
	160	0.46	56
450	65	0.19	50
	160	0.41	71

ที่มา : Battat และคณะ (1990)

การผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 เป็นกระบวนการที่มีออกซิเจน ดังนั้นอัตราการกวน ความดันอากาศ และอัตราการเติมอากาศ เป็นสิ่งสำคัญต่อการถ่ายโอนออกซิเจน นอกจากนี้อัตราการกวนยังมีผลต่อสัณฐานวิทยาของ *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 โดยอัตราการกวนที่ช้าสุด 300 รอบต่อนาที ส่งผลต่อการสร้าง pellet และร้อยละผลได้ของกรดมาลิกที่ต่ำเท่ากับ 51 โมลต่อโมลน้ำตาล ขณะที่อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที จะได้รับร้อยละผลได้ของกรดมาลิกที่สูงเท่ากับ 71 โมลต่อโมลน้ำตาล ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเส้นสาย และพบว่าอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เพียงพอต่อการหมักนี้ โดยการผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะการหมักนี้คล้ายกับสภาวะการผลิตกรดฟูมาริกและกรดมาลิกโดย *R. oryzae* พบว่าอัตราการให้อากาศที่มากกว่า 0.5 vvm จะไม่ส่งผลต่อการผลิตกรดฟูมาริกและกรดมาลิก (Goldberg และคณะ, 1985; Rhodes และคณะ 1962) จากรายงานของ Brierley และ Steel (1959) พบว่าอัตราการกวนส่งผลต่อการถ่ายโอนออกซิเจนมากกว่าการเติมอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากงานวิจัยของ Battat และคณะ (1990) นี้ พบว่าอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นของ *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 จะเพิ่มความเข้มข้นของกรดมาลิกให้สูงขึ้น ซึ่งคล้ายกับการผลิตกรดฟูมาริกโดย *R. oryzae* (Rhodes และคณะ, 1962)

จากการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก โดยศึกษาผลของการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการทดลองก่อนหน้าของ Abe และคณะ (1962) ที่เพาะเลี้ยง *A. flavus* โดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจน 387 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงเป็น 271 มิลลิกรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนโดยใช้อาหาร acid production medium ที่ประกอบด้วยกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร PO_4^{3-} 6.5 มิลลิโมลลาร์ อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จะได้รับร้อยละผลได้ของกรดมาลิกสูงสุดเท่ากับ 98 โมลต่อโมลน้ำตาล และสามารถผลิตกรดมาลิกได้ความเข้มข้นสูงสุด 41 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.5 นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น มีความสอดคล้องกับชีวมวลที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน

ต่ำสุด 154 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.3 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงสุด 520 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 11.5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.5 การผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน

ความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่ถูกใช้ (โมล)	ร้อยละผลได้ของกรดมาลิก (โมลต่อโมลน้ำตาล)
154	4.3	0.13	80
271	7.4	0.31	98
307	4.3	0.19	95
387	9.5	0.42	63
435	10.3	0.30	65
480	11.1	0.35	67
520	11.5	0.46	56

ที่มา : Battat และคณะ (1990)

จากการศึกษาไอออนโลหะที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนโดยใช้อาหาร acid production medium ที่ประกอบด้วยกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร PO_4^{3-} 6.5 มิลลิโมลาร์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 271 มิลลิกรัม อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยไอออนที่นำมาศึกษา ได้แก่ Fe^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2.6 พบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{2+} จาก 0.4 เป็น 2.0 และ 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และเติม Mg^{2+} 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้รับร้อยละผลได้ของกรดมาลิก 71 86 และ 93 โมลต่อโมลน้ำตาลตามลำดับ และหากเติม Mg^{2+} เพิ่มขึ้นจาก 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปถึง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสังเกตเห็นว่าจากตารางที่ 2.6 เมื่อเติม Fe^{2+} 12 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม Mg^{2+} 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้รับร้อยละผลได้ของกรดมาลิกสูงสุด 107 โมลต่อโมลน้ำตาล และพบว่าการเติม Mn^{2+} ในอาหาร acid production medium จะไปยับยั้งการผลิตกรดมาลิก

ตารางที่ 2.6 การผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ที่มีความเข้มข้นของไอออนโลหะแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของไอออนโลหะ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			กลูโคสที่ถูกใช้ (โมล)	ร้อยละผลได้ของกรดมาลิก (โมลต่อโมลน้ำตาล)
Fe ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺		
0.4	4	-	0.28	71
2.0	4	-	0.27	86
12.0	4	-	0.24	93
12.0	10	-	0.18	107
12.0	40	-	0.23	101
12.0	40	0.05	0.49	36
18.0	10	-	0.37	100
24.0	10	-	0.39	81

ที่มา : Battat และคณะ (1990)

หมายเหตุ ไอออน Fe²⁺ ได้จากการเติม FeSO₄·7H₂O
ไอออน Mg²⁺ ได้จากการเติม MgSO₄·7H₂O
ไอออน Mn²⁺ ได้จากการเติม MnSO₄·4H₂O

จากการทดลอง พบว่าไอออนของโลหะมีผลต่อการผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 จากไอออนโลหะที่นำมาตรวจสอบ พบว่าความเข้มข้นของ Fe²⁺ ที่เหมาะสมร่วมกับความเข้มข้นของ Mg²⁺ จะได้รับร้อยละผลได้ของกรดมาลิกสูงสุด 107 โมลต่อโมลน้ำตาล และการเติม Mn²⁺ ทำให้กรดมาลิกลดลง ซึ่งเป็นผลในทางตรงกันข้ามกับงานวิจัยของ Abe และคณะ (1962) ที่รายงานว่า การเติม Mn²⁺ จะทำให้ความเข้มข้นของกรดมาลิกสูงขึ้น

จากการศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนโดยใช้อาหาร acid production medium ที่ประกอบด้วยกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร (NH₄)₂SO₄ 271 มิลลิกรัม อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Abe และคณะ (1962) ที่เพาะเลี้ยง *A. Flavus* โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟต 6.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้เพิ่มและลดความเข้มข้นของฟอสเฟต โดยพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นฟอสเฟต 32.5 มิลลิโมลาร์ ร้อยละผลได้ของกรดมาลิกจะลดลง อย่างไรก็ตามพบว่า การลดความเข้มข้นของฟอสเฟตเป็น 1.5 มิลลิโมลาร์ จะได้ค่าร้อยละผลได้ของกรดมาลิกเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 2.7 โดยพบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ต่ำเป็นผลดีต่อการผลิตกรดมาลิก โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของ Fe²⁺ ที่แตกต่างกัน พบว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟต 1.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นไนโตรเจน 271 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้น Fe²⁺ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้รับร้อยละผลได้ของกรดมาลิกสูงสุด 128 โมลต่อโมลน้ำตาล

ตารางที่ 2.7 การผลิตกรดมาลิกโดย *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตแตกต่างกัน

ความเข้มข้น			กลูโคสที่ถูกใช้ (โมล)	ร้อยละผลได้ของกรดมาลิก (โมลต่อโมลน้ำตาล)
PO ₄ ³⁻ (มิลลิโมลาร์)	ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Fe ²⁺ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
1.5	387	2	0.36	107
1.5	387	12	0.45	108
1.5	271	12	0.45	128
2.5	387	2	0.43	78
6.5	387	2	0.40	70
6.5	271	2	0.27	86
6.5	271	12	0.18	107
32.5	387	2	0.29	60

ที่มา : Battat และคณะ (1990)

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตมาลิกได้เปรียบเทียบภายใต้สภาวะ 2 สภาวะ ซึ่งให้ผล การผลิตกรดมาลิกต่ำและสูง ดังรูปที่ 2.20 และ 2.21 พบว่าภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของ กรดมาลิกต่ำ ได้เพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนโดยใช้อาหาร acid production medium ที่ประกอบด้วย กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร (NH₄)₂SO₄ 1.8 กรัมต่อลิตร (387 มิลลิกรัมต่อ 1 ไนโตรเจน) PO₄³⁻ 0.62 กรัมต่อลิตร CaCO₃ 65 กรัมต่อลิตร และ Fe²⁺ 0.012 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยจากรูปที่ 2.20 พบว่าความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและเข้าสู่ ระดับคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 100 ชั่วโมง ในระหว่างการหมัก พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจากเริ่มต้นที่ 7.00 เหลือ 5.80 และคงอยู่ตลอดการหมัก โดยใช้น้ำตาลกลูโคสใช้หมดเมื่อเวลาผ่านไป 145 ชั่วโมง โดยผลิตกรดมาลิกได้สูงสุด 36 กรัมต่อลิตร และภายใต้สภาวะได้ความเข้มข้นของกรดมาลิก สูง ได้เพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนโดยใช้อาหาร acid production medium ที่ประกอบด้วย กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร (NH₄)₂SO₄ 1.2 กรัมต่อลิตร PO₄³⁻ 0.14 กรัมต่อลิตร CaCO₃ 65 กรัมต่อลิตร และ Fe²⁺ 0.012 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จากรูปที่ 2.21 พบว่ากรด มาลิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึง 185 ชั่วโมง โดยผลิตกรดมาลิกได้ 77 กรัมต่อลิตร และพบว่าไนโตรเจน ถูกใช้จนหมดใน 65 ชั่วโมง ในระหว่าง 160 ชั่วโมงของการหมักพีเอชลดลงอย่างช้าๆจากเริ่มต้น 7.00 เป็น 6.15 และจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วหลัง 198 ชั่วโมง เหลือ 5.10 และอัตราการใช้กลูโคสลดลง จนสิ้นสุดการหมัก พบว่าน้ำตาลถูกใช้ประมาณร้อยละ 70 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอชในน้ำหมัก ลดลงถึง 5.10 และอัตราการใช้กลูโคสและการผลิตกรดมาลิกลดลงหลัง 185 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าที่ สภาวะนี้แคลเซียมคาร์บอเนตถูกใช้จนหมด แต่เมื่อทดสอบที่สภาวะความเข้มข้นของกรดมาลิกสูง แต่ ใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 90 กรัมต่อลิตร แทนปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 65 กรัมต่อลิตร

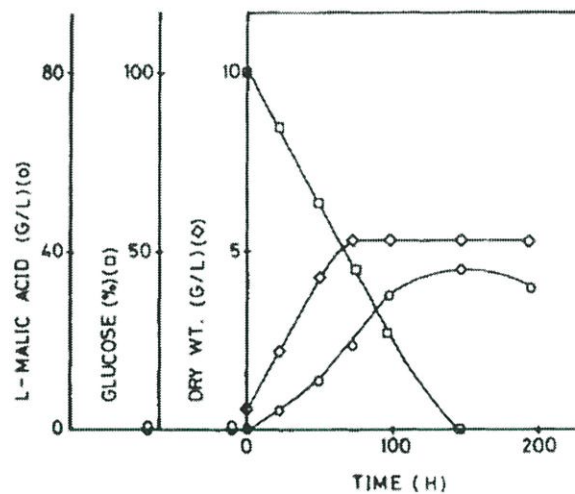
พบว่าพีเอชจะสูงกว่า 6.1 ตลอดการหมัก โดยพบว่ากลูโคสจะถูกใช้จนหมดหลัง 190 ชั่วโมง และได้ความเข้มข้นกรดมาลิกสูงสุด 113 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.8 และให้ค่าผลิตภาพ 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 2.8 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิก ร้อยละผลได้ และค่าผลิตภาพเมื่อเพาะเลี้ยง

A. flavus สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกต่ำและสูง

สภาวะที่ศึกษา	ร้อยละผลได้ของกรดมาลิก (โมลต่อโมลน้ำตาล)	ความเข้มข้นของกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)	ค่าผลิตภาพ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ความเข้มข้น กรดมาลิกต่ำ	51	36	0.24
ความเข้มข้น กรดมาลิกสูง	128	77	0.41
CaCO ₃ (9%)	126	113	0.59

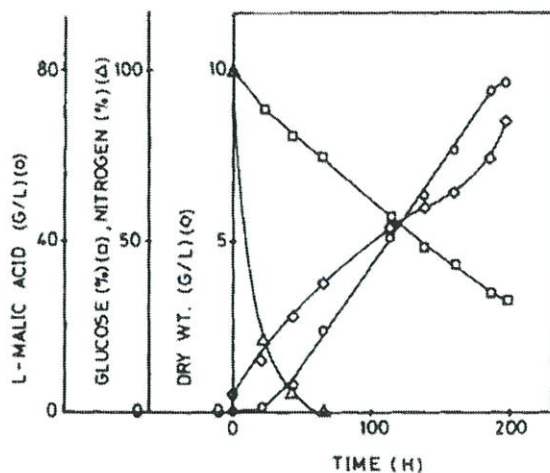
ที่มา : Battat และคณะ (1990)



รูปที่ 2.20 จลนศาสตร์ของการผลิตกรดมาลิกเมื่อเพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกต่ำ

ที่มา : Battat และคณะ (1990)

- หมายเหตุ
- แทน ความเข้มข้นกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)
 - แทน ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
 - ◇ แทน ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 2.21 จลนศาสตร์ของการผลิตกรดมาลิกเมื่อเพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 ภายใต้สภาวะที่ได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกสูง

ที่มา : Battat และคณะ (1990)

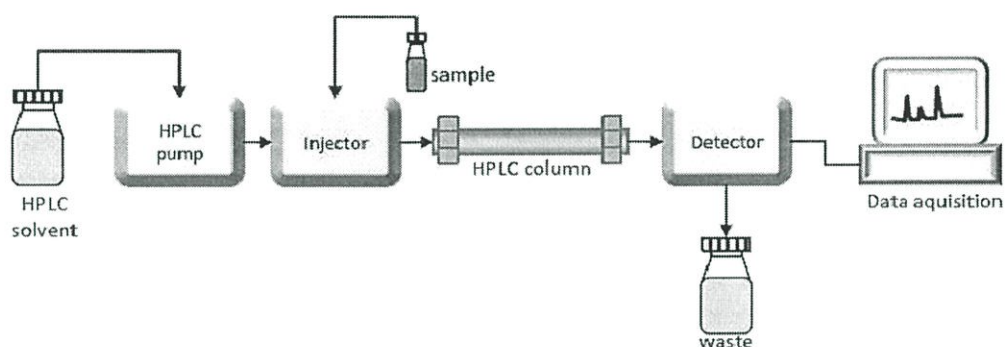
หมายเหตุ

- แทน ความเข้มข้นกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)
- แทน ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
- ◇ แทน ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
- △ แทน ความเข้มข้นไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)

ในการทดลอง พบว่ามีการเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะใช้เป็นสารปรับเสถียรและรักษาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมัก โดยจะได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกสูงขึ้นจาก 77 กรัมต่อลิตรเป็น 113 กรัมต่อลิตร จากการใช้น้ำตาลกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกของการเพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 พบว่าใช้แหล่งคาร์บอนจนหมด ดังนั้นในการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนอาจนำไปสู่การผลิตกรดมาลิกที่เพิ่มขึ้นได้ และพบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นเหตุที่ทำให้ค่าผลิตภาพเพิ่มขึ้นจาก 0.41 เป็น 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยพบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นตัวให้คาร์บอนไดออกไซด์แก่ไพรูเวตและจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตตและมาเลตตามลำดับ

2.12 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมที่อยู่ในสถานะของเหลว ประกอบด้วย 2 เฟสคือ เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เฟสเคลื่อนที่ คือตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง HPLC สารดังกล่าวจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยตัวทำละลายอินทรีย์ผสมเกิดการแยกสาร (Separation) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา (Interaction) ระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ (Stationary phase) และความสามารถในการละลายของสารผสมสำหรับเครื่อง HPLC มีองค์ประกอบหลักดังนี้ เครื่องสูบลม (pump) ตัวฉีด (injector) คอลัมน์ (column) ตัวตรวจหา (detector) และเครื่องบันทึกผล เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ อีก เช่น ตัวทำละลาย (solvent) สารละลายมาตรฐานใช้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบหาปริมาณสารในสารตัวอย่าง และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา : <http://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/>

High-performance-liquid-chromatography-hplc.jpg

2.12.1 ตัวทำละลาย HPLC Solvent

ตัวทำละลายนี้ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งมีความจำเพาะขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการแยกหรือสารที่เราสนใจ ตัวทำละลายนี้จะบรรจุอยู่ในรีเซอร์วัวร์ (Reservoir) ตัวทำละลายในระบบ HPLC ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่สำคัญคือ ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากสิ่งเจือปนและไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ตัวฉีด (injector) คอลัมน์ (column) ตัวตรวจหา (detector) หรือ สารที่สนใจที่ต้องการแยก นอกจากนี้พบว่าความหนืดมีผลต่อการวิเคราะห์ เมื่อมีสิ่งสกปรกจะรบกวนการทำงานของระบบทำให้ประสิทธิภาพของระบบลดน้อยลง และแก๊สที่เจือปนในตัวทำละลายจะทำให้แก๊สที่ละลายอยู่ไปรบกวนอัตราการไหลขณะทำการวิเคราะห์ วิธีการแก้ไขการตกค้างของแก๊สในตัวทำละลายทำได้โดยการใช้แก๊สเฉื่อยซึ่งไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ ทำหน้าที่ไล่แก๊สอื่นที่ละลายอยู่ส่วนสิ่งสกปรกที่เจือปนอยู่มีวิธีป้องกันโดยระบบการกรองอนุภาคโดยใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนและสูญญากาศก่อนที่เข้าสู่รีเซอร์วัวร์ (Reservoir) (Skooog และคณะ, 1986)

2.12.2 เครื่องสูบล (Pump)

มีหน้าที่สูบลของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลเข้าไปในคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 0.1-10 มิลลิลิตรต่อนาที อีกทั้งยังรักษาอัตราการไหลให้คงที่ในช่วงอัตราเร็วช่วงใดช่วงหนึ่ง ผิดพลาดได้ไม่เกินร้อยละ 2 ของปริมาตรที่ทำการสูบล ต้องปล่อยสารให้เป็นอิสระ ความดันที่อัดเข้าไปในคอลัมน์ต้องมีความดันที่ปกติอยู่ที่ระดับ 6000 psi หรือปอนด์ต่อตารางนิ้ว และทนต่อการกัดกร่อนของตัวทำละลาย (Solvent) นอกจากนี้ต้องมีอัตราการแพร่ของสารไม่น้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Skooog และคณะ, 2007) เครื่องสูบลที่นิยมใช้มีอยู่ 3 ชนิดดังนี้

- (1) ชนิดไซริงก์ (syringe type)
- (2) ชนิดแทนที่ของเหลว(reciprocating piston type)
- (3) ชนิดความดันคงที่(constant pressure pump)

2.12.3 ตัวฉีด (Injector)

อุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5-10 ไมโครลิตร อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการฉีดตัวอย่างของเครื่อง HPLC ที่นิยมใช้กันมีชื่อเรียกว่า Sampling loop อุปกรณ์สำหรับการฉีดตัวอย่าง ในปัจจุบันเครื่อง HPLC ที่ใช้เป็นระบบฉีดแบบอัตโนมัติ โดยสามารถนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบโดยนำตัวอย่างที่เราสนใจใส่ลงในขวด vial หรือ ไมโครไตเตอร์เพลท (Microtiter plates) ส่วนใหญ่แล้วปริมาตรของตัวอย่างจะเริ่มต้นน้อยสุดที่ 1 ไมโครลิตร หรือมากกว่า 1 มิลลิลิตรก็ได้ขึ้นกับผู้ต้องการวิเคราะห์

2.12.4 คอลัมน์ (Column)

คอลัมน์ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) คอลัมน์อาจทำจากแก้ว ท่อสแตนเลสสตีลพื้นผิวเรียบ เหล็กกล้าไร้สนิม บ้างอาจใช้เป็นโพลีเมอร์ ชนิดโพลีอีเทอร์อีเทอร์-คีโตน โดยทั่วไปความยาวของคอลัมน์จะมีตั้งแต่ 10-150 ซม. กรณีที่มีความยาวมากเกินคอลัมน์ถูกขัดเป็นวง พบว่าประสิทธิภาพในการแยกสารจะลดลง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์มีขนาด 3 มิลลิเมตรหรือ 5 มิลลิเมตร ขนาดของตัวดูดซับภายในคอลัมน์มีขนาด 3-5 ไมโครเมตร คอลัมน์สามารถทนแรงดันได้สูงถึง 6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ (Studt, 1994) ชนิดของคอลัมน์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักๆคือ Pellicular particle และ Porous particle

2.12.5 ตัวตรวจจับสาร (Detector)

ตัวตรวจจับสาร (detector) ทำหน้าที่ตรวจวัดปริมาณสาร เพื่อส่งให้เครื่องบันทึกผลทำการบันทึกค่าและแสดงกราฟของสารชนิดต่าง ๆ ตัวตรวจหามีหลายชนิดขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่ต้องการตรวจหา ตัวอย่างเช่นตัววัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ใช้สำหรับวัดปริมาณสารที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ตัวไวแสง (photo detector) ใช้สำหรับการวัดสารที่มีสีหรือมีความขุ่นและตัววัดดัชนีหักเห (refractive index detector) ใช้สำหรับวัดสารละลายที่ใส และมีตัวถูกละลาย เป็นต้น (Skooog และคณะ, 2007)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.1.2 ปีกเกอร์
- 3.1.3 กระบอกตวง
- 3.1.4 ปีเปต
- 3.1.5 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.1.6 ขวดบรรจุอาหาร (Duran)
- 3.1.7 หลอดทดลอง
- 3.1.8 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.10 ลูกยางดูดสาร
- 3.1.11 ซ้อนตักสาร
- 3.1.12 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Plate)
- 3.1.13 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.14 ขวดไวแอล (Vial)
- 3.1.15 กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร
- 3.1.16 ตัวกรองที่มีขนาดช่องผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน
- 3.1.17 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) ยี่ห้อ Mortek รุ่น PH500 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.18 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ยี่ห้อ VELP Scientific ประเทศอิตาลี
- 3.1.19 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.20 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ NEW BRUNSWICK รุ่น innova 4230 ประเทศแคนาดา
- 3.1.21 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น SI-234 ประเทศเยอรมัน
- 3.1.22 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Issco รุ่น BV T123 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.23 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm รุ่น Polar 1000 ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.1.24 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel Lab รุ่น 1375 FX forced air oven ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.25 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLE Labortechnik GmbH รุ่น Z326K ประเทศเยอรมัน
- 3.1.26 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1201V ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.27 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น LC-20A ประเทศญี่ปุ่น

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 Glucose (C₆H₁₂O₆) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.2 Xylose (C₅H₁₀O₅) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.3 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ
- 3.2.4 Ammonium chloride (NH₄Cl) ยี่ห้อ Ajax Finechem Pty ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.5 Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagents ประเทศอิตาลี
- 3.2.6 Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO₄·7H₂O) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.7 Calcium carbonate (CaCO₃) ยี่ห้อ Ajax Finechem Pty ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.8 Peptone
- 3.2.9 Agar
- 3.2.10 Alcohol 70%
- 3.2.11 Alcohol 95%
- 3.2.12 TE (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)
- 3.2.13 10% SDS
- 3.2.14 Protease K 1 mg/ml (Store at -20 °C)
- 3.2.15 5M NaCl
- 3.2.16 CTAB/NaCl solution (0.7 M NaCl, 10% (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammonium-bromide)
- 3.2.17 Chloroform/Isoamyl Alcohol (25 : 24 : 1) (PCI)
- 3.2.18 Isopropanol
- 3.2.19 Ethanol 70%
- 3.2.20 RNase solution (dissolve in 10 mg RNase /ml in 10 mM Tris·HCl, 15 mM
- 3.2.21 NaCl (pH 7.5)
- 3.2.22 Ethanol 99.5%
- 3.2.23 3M Sodium acetate buffer (pH 5.0)
- 3.2.24 Nuclease-Free Water
- 3.2.25 1X TAE
- 3.2.26 *Taq* DNA Polymerase with Standard *Taq* Buffer (ยี่ห้อ NEB Biotech รุ่น M0273S)
- 3.2.27 Buffer PB (5 M Gu·HCl, 30% isopropanol)
- 3.2.28 Buffer PE (10 mM Tris·HCl pH 7.5, 80% ethanol)
- 3.2.29 Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5)
- 3.2.30 ชุด QIAquick[®] PCR Purification Kit (ยี่ห้อ QIAGEN)

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษา

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (ปภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า, 2014) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร Shaker culture medium (Tabuchi และคณะ, 1981) ที่มีกลูโคสหรือไซโลส ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้ในปริมาณสูงสุด 3 ลำดับแรก คือ MG3 ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติในคลองสระบัว ภายในคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลิตได้สูงสุดถึง 12.846 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ LG1 คัดแยกได้จากแหล่งดินชุมชน บริเวณใต้ถุนบ้าน อ.หนองเรือ จ.ขอนแก่น ผลิตได้ 5.260 กรัมต่อลิตร และ NG6 คัดแยกได้จากแหล่งดินชุมชน บริเวณกองขยะ ซ.เก็กงาม 2 ผลิตได้ 3.288 กรัมต่อลิตร โดยทั้ง 3 ไอโซเลต ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบแบคทีเรียที่น่าสนใจที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูง โดยคัดแยกได้จากลำไยเน่า ผลิตกรดมาลิกได้สูงถึง 26.532 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตมาทำการศึกษาคือ

3.3.2 การตรวจสอบการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก

3.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ผที่สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้ในอาหารแข็งเอียง Selective media (ประกอบด้วย glucose 10 กรัมต่อลิตร, yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัมต่อลิตร, CaCO_3 1 กรัมต่อลิตร, Agar 1 กรัมต่อลิตร) (Tabushi และคณะ, 1981) และทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต BX1 ที่สามารถผลิตกรด มาลิกได้ในอาหารแข็งเอียง Selective media (ประกอบด้วย xylose 10 กรัมต่อลิตร, yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัมต่อลิตร, CaCO_3 1 กรัมต่อลิตร, Agar 1 กรัมต่อลิตร) (Tabushi และคณะ, 1981) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว Selective media ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้หัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.95 - 1.05

3.3.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.95-1.05 (จากข้อ 3.3.1.1) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร Shaker culture (Tabuchi และคณะ, 1981) ที่มีความเข้มข้นกลูโคสหรือไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไอโซเลต MG3 และ LG1 ใช้เวลา 7 วัน ไอโซเลต NG6 ใช้เวลา 5 วัน ส่วนไอโซเลต BX1 ใช้เวลา 4 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำ

เลี้ยงมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC

นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.2.2 ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC

โดยมีรายละเอียดของเครื่อง HPLC และสภาวะที่ใช้ดังนี้

ยี่ห้อ	: Shimadzu model LC-20A
คอลัมน์	: Aminex® HPX-87H Column (300x7.8 mm)
เฟสเคลื่อนที่	: กรดซัลฟิวริก (H ₂ SO ₄) 0.005 โมลาร์
อัตราการไหล	: 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ	: 30 องศาเซลเซียส
ตัวตรวจวัด	: UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และฐานข้อมูลทางชีวภาพ

3.3.3.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (Kosugi, 2010)

3.3.3.1.1 เก็บเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 60 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 หรือ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ต่อไป

3.3.3.1.2 ชั่งน้ำหนักเซลล์ปริมาณ 0.15 กรัม ลงในหลอดเซนติฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 567 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และ MEDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา

3.3.3.1.3 เติม Sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเอนไซม์ Protease K ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.3.1.4 เติมสารละลาย Sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา

3.3.3.1.5 เติมสารละลายผสมระหว่าง CTAB และ NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ประกอบด้วย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.6 กำจัดโปรตีนโดยการเติมสารละลายผสมระหว่าง Chloroform และ Isoamyl alcohol (CI) อัตราส่วน 24 :1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมาเป็นเวลา 20-30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.7 ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงหลอดเซนติฟิวซ์หลอดใหม่โดยระมัดระวังการปนเปื้อนของตะกอนโปรตีน

3.3.3.1.8 กำจัดโปรตีนที่เหลือด้วยสารละลายผสมระหว่าง Phenol Chloroform และ Isoamyl alcohol (PCI) อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา เป็นเวลา 20-30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.9 ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงหลอดเซนติฟิวซ์หลอดใหม่โดยระมัดระวังการปนเปื้อนของตะกอนโปรตีน

3.3.3.1.10 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3.3.3.1.8-3.3.3.1.9 ประมาณ 2 ครั้ง

3.3.3.1.11 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม Isopropanal ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา จะสังเกตเห็นจีโนมิคดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.12 เติสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเกล็ดที่ติดมากับตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.13 เติสารละลาย TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.3.1.14 เติสารละลายผสม PCI ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมาเป็นเวลา 20-30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.15 นำสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วเติมเอทานอลเย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.1.16 เติสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการตั้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3.1.17 เติสารละลาย TE หรือ น้ำกลั่น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมา

3.3.3.1.18 การตรวจสอบขนาดและคุณภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ความต่างศักย์ 180 โวลต์ 250 มิลลิแอมป์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 1,000 คู่เบส ยี่ห้อ New England Biolabs®

3.3.3.1.19 นำแผ่นอะกาโรสเจล มาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำอีก 15 นาที ตรวจสอบแถบจีโนมคิตีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.3.3.1.20 นำจีโนมคิตีเอ็นเอที่สกัดได้มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

3.3.3.2.1 นำดีเอ็นเอแม่แบบมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA ในหลอดทดลอง โดยเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร
10X Standard Taq Reaction Buffer *	5 ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1 ไมโครลิตร
10 μ M Forward Primer **	1 ไมโครลิตร
10 μ M Reverse Primer ***	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.25 ไมโครลิตร
Template DNA	1 ไมโครลิตร
Nuclease-Free Water	40.75 ไมโครลิตร

หมายเหตุ

* 10X Standard Taq reaction

ประกอบด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์
KCl ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์
MgCl₂ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์
pH 8.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

** Forward Primer คือ 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

*** Reverse Primer คือ 1492R (5'-GGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

(Vickerman และคณะ, 2007)

3.3.3.2.2 ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
* 30 Cycles	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	50 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	68 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที
Final Extension	68 องศาเซลเซียส	5 นาที
Hold	12 องศาเซลเซียส	

หมายเหตุ

* 30 Cycles ที่ใช้

1. การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีเบสคู่สมจับกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่เสียสภาพด้วยความร้อนแยก จากกันเป็นสายเดี่ยว ซึ่งเป็นการทำลายพันธะไฮโดรเจน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส (อนุรักษ โปธิเอียม และสุพัตรา โปธิเอียม, 2557)

2. การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด เข้าไปจับกับเบสคู่สมบนต้นแบบของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Template)

ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (อนุรักษ โปธิเอียม และสุพัตรา โปธิเอียม, 2557)

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'-OH ของไพรเมอร์ตามเบสคู่สมของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ โดยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส (อนุรักษ โปธิเอียม และสุพัตรา โปธิเอียม, 2557)

3.3.3.2.3 ตรวจสอบขนาดและคุณภาพของผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTAE โดยนำชิ้นส่วน 16S rRNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ความต่างศักย์ 180 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 15 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 1,000 คู่เบส ยี่ห้อ New England Biolabs[®]

3.3.3.3 การทำชิ้นส่วน 16S rRNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick[®] PCR

Purification Kit

3.3.3.3.1 เติมสารละลาย Buffer PB * ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมชิ้นส่วน 16S rRNA จากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.3.3.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.3.3.3.3 ย้ายเฉพาะคอลัมน์ลงในหลอดเซนต์ริฟซ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย Buffer PE ** ปริมาตร 700 ไมโครลิตร

3.3.3.3.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.3.3.3.5 นำสารละลายบัฟเฟอร์ออก แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที

3.3.2.3.6 ย้ายเฉพาะคอลัมน์ลงในหลอดเซนต์ริฟซ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย Buffer EB *** ปริมาตร 53 ไมโครลิตร โดยหยดบัฟเฟอร์ ทั้งไว้เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้บัฟเฟอร์ซึมผ่านเมมเบรน

3.3.3.3.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.3.3.3.8 นำชิ้นส่วน 16S rRNA บริสุทธิ์ไปตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel ใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE จากนั้นนำชิ้นส่วน 16S rRNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ความต่างศักย์ 180 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 15 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 1,000 คู่เบส ยี่ห้อ New England Biolabs[®]

3.3.3.3.9 นำชิ้นส่วน 16S rRNA บริสุทธิ์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บในหลอดเซนติฟิวซ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปหาลำดับเบสของอาร์เอ็นเอเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยวิธี 16S rRNA Gene Sequencing

หมายเหตุ

* Buffer PB (Phosphate Buffer)

ประกอบด้วย 5 M Gu-HCl, 30% isopropanol

ใช้ในขั้นตอนการทำความสะอาดดีเอ็นเอ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่บน spin-column membrane

** Buffer PE (Phosphate Elution Buffer)

ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% ethanol

เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างในขั้นตอนการทำความสะอาดดีเอ็นเอ

*** Buffer EB (Elution Buffer)

ประกอบด้วย 10 mM Tris-Cl, pH 8.5

ใช้ในการชะล้างดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์

3.3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.4.1 การย้อมแกรม

ทำการย้อมแกรมเพื่อศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และจำแนกแกรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ อายุของเชื้อที่ใช้ในการย้อมแกรมจะอยู่ในช่วงระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยนำลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) ที่เผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ไปแตะหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อมาเผาไฟจนร้อนแดงอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อผสมกับหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด เกลี่ยเชื้อ (Smear) ที่อยู่ในหยดน้ำให้กระจายออกเป็นบริเวณบางๆ จากนั้นทำให้เชื้อแห้งติดบนสไลด์ (Fix) โดยนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อนๆ ประมาณ 2-3 ครั้ง ปล่อยให้สไลด์เย็นลง แล้วหยดสีคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นหยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (Lugol's iodine) เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด แล้วจึงหยดสีซาฟรานิน (Safranin) เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ซับรอบๆ รอยเกลี่ยให้แห้ง แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

ของซาฟรานิน จากนั้นจึงนำลักษณะของแบคทีเรียที่ได้มาระบุชนิดของแบคทีเรีย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

3.3.4.2 การย้อมสปอร์

ทำการย้อมสปอร์เพื่อศึกษาการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ อายุของเชื้อที่ใช้ในการย้อมสปอร์จะอยู่ในช่วงระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยนำลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) ที่เผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ไปแตะหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อมาเผาไฟจนร้อนแดงอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อผสมกับหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ เกลี่ยเชื้อ (Smear) ที่อยู่ในหยดน้ำให้กระจายออกเป็นบริเวณบางๆ จากนั้นทำให้เชื้อแห้งติดบนสไลด์ (Fix) โดยนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อนๆ ประมาณ 2-3 ครั้ง ปลอ่ยให้สไลด์เย็นลง แล้วหยดมาลาโคท์กรีน (malachite green) ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ นำไปวางบนไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และคอยเติมมาลาโคท์กรีน เพื่อไม่ให้สีแห้ง เทสีทิ้ง รอให้สไลด์เย็น ล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นหยดสีซาฟรานิน (Safranin) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสีทิ้งแล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ซับรอบๆ รอยเกลี่ยให้แห้ง แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตัวเซลล์ปกติจะติดสีแดงของซาฟรานิน ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของมาลาโคท์กรีน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

3.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคโดยโอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 หรือกรดมาลิกโดยโอโซเลต BX1

3.3.5.1 การศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

ทำการศึกษาโดยใช้อาหารสูตร Shaker culture medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอน 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ทำการแยกฆ่าเชื้อระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยโอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.95-1.05 ส่วนโอโซเลต BX1 ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.95-1.05 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยโอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้เวลา 7 วัน โอโซเลต BX1 ใช้เวลา 3 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยง โดยโอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 เก็บตัวอย่างความเข้มข้นละ 6 มิลลิลิตร ต่อวัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน แล้วนำส่วนใสที่กรองได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS method และตรวจสอบค่าพีเอช

3.3.5.2 การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้ผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

หลังจากการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนแล้ว จะทราบถึงปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยใช้อาหารสูตร Shaker culture medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ทำการแยกฆ่าเชื้อระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.95-1.05 ไอโซเลต BX1 ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.95-1.05 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้เวลา 7 วัน ไอโซเลต BX1 ใช้เวลา 3 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยง โดยไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 เก็บตัวอย่างความเข้มข้นละ 6 มิลลิลิตรต่อวัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปกรองต่อด้วย ชุดกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน แล้วนำส่วนใสที่กรองได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS method และตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.3.5.3 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลด้วย DNS method (Miller, 1959)

3.3.5.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้น 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3.5.3.2 เตรียมสารละลาย Blank เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.3.5.3.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงในแต่ละความเข้มข้นของไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 ที่เก็บในแต่ละวัน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสหรือไซโลส แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 แบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษา

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยปภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า (2014) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร Shaker culture medium (Tabuchi และคณะ, 1981) ที่มีความเข้มข้นกลูโคสหรือไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้ในปริมาณสูงสุด 3 ลำดับแรก คือ ไอโซเลต MG3 ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติในคลองสระบัว ภายในคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลิตได้สูงสุดถึง 12.846 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลต LG1 คัดแยกได้จากแหล่งดินชุมชน บริเวณใต้ถุนบ้าน อ.หนองเรือ จ.ขอนแก่น ผลิตได้ 5.260 กรัมต่อลิตร และไอโซเลต NG6 คัดแยกได้จากแหล่งดินชุมชน บริเวณกองขยะ ซ.เก็กงาม 2 ผลิตได้ 3.288 กรัมต่อลิตร โดยทั้ง 3 ไอโซเลต ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบแบคทีเรียที่น่าสนใจที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูง คือ ไอโซเลต BX1 คัดแยกได้จากลำไยเน่าผลิตกรดมาลิกได้สูง 26.532 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาต่อ

4.2 การตรวจสอบการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ในอาหารเหลวสูตร Shaker culture medium (Tabuchi และคณะ, 1981) ที่มีความเข้มข้นกลูโคสหรือไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงไป บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน แล้วนำส่วนใสที่กรองได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกโดยเปรียบเทียบจากการศึกษาก่อนหน้านี้

Isolate	Medium	Acid	Concentration (g/L)	
			Previous study	This study
MG3	Shaker culture medium	Adipic acid	12.846	7.512
LG1	Shaker culture medium	Adipic acid	5.260	5.531
NG6	Shaker culture medium	Adipic acid	3.288	4.213
BX1	Shaker culture medium	Malic acid	26.532	44.370

จากตารางที่ 4.1 แสดงผลการผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกโดยเปรียบเทียบจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าไอโซเลต MG3 LG1 NG6 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Shaker culture medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยไอโซเลต MG3 ผลิตกรดอะดิพิคได้ความเข้มข้น 7.512 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นที่ต่ำกว่างานวิจัยของ ปภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณนิภา ยอดสง่า (2014) ที่ผลิตกรดอะดิพิคได้ความเข้มข้น 12.846 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลอง โดยในงานวิจัยของ ปภัสสร เทพกัณฑ์ และ สุพรรณนิภา ยอดสง่า (2014) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1-2 ลูก แต่ในงานวิจัยนี้ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 หลอดทดลอง ทำให้ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 เพื่อผลิตกรดอะดิพิคได้ ไอโซเลต LG1 สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้ความเข้มข้น 5.260 กรัมต่อลิตร และไอโซเลต NG6 สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้ความเข้มข้น 4.213 กรัมต่อลิตร ซึ่งทั้งสองไอโซเลตมีความเข้มข้นสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้าเล็กน้อย และไอโซเลต BX1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Shaker culture medium ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิกได้ความเข้มข้น 44.370 กรัมต่อลิตร ดังนั้นทั้ง 4 ไอโซเลตที่กล่าวมาข้างต้นยังมีความสามารถในการผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกได้

4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และฐานข้อมูลทางชีวภาพ

จากการศึกษาแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 ของ ปภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า (2014) พบว่ามีความสามารถในการผลิตกรดอะดีพิคหรือ กรดมาลิก เมื่อนำมาสกัดจีโนมดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด โดยเป็นบริเวณที่มีลำดับอนุรักษ์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยไพรเมอร์ 8F และ 1492R ซึ่งเป็น universal primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรีย (Vickerman และคณะ, 2007) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้ Blast เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย เมื่ออาศัยความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 98 ซึ่งจะถูกจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า หากเป็นสปีชีส์ใหม่จะต้องมีค่าความคล้ายคลึง (identity) น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 98.5 และหาเป็นจีนัสใหม่จะต้องมีค่าความคล้ายคลึง (identity) น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95 (ปิ่นสุรางค์ ดิวังษ์, 2012) พบว่า ไอโซเลต MG3 มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus warneri* ร้อยละ 96 ไอโซเลต LG1 มีความคล้ายคลึงกับ *Pluralibacter gergoviae* ร้อยละ 99 ไอโซเลต NG6 มีความคล้ายคลึงทั้งกับ *Staphylococcus warneri* ร้อยละ 78 และ *Staphylococcus pasteurii* ร้อยละ 78 แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต NG6 มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus sp.* และไอโซเลต BX1 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter persici* ร้อยละ 99 แสดงข้อมูลดังตาราง 4.2


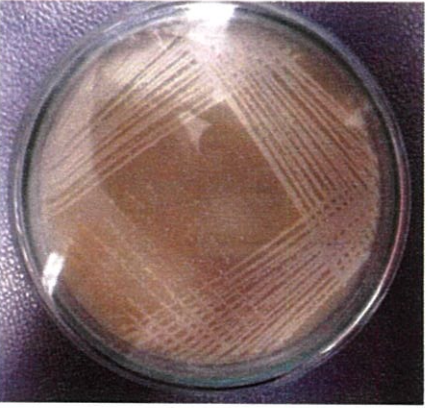
ตารางที่ 4.2 แสดงการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

รอบ	เชื้อ	Query Length	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity
MG3	<i>Staphylococcus warneri</i>	1010	1661	1661	100%	0.0	96%
LG1	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	1340	2403	2403	99%	0.0	99%
NG6	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1028	569	569	92%	7e-162	78%
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1028	569	569	92%	7e-162	78%
BX1	<i>Acetobacter persici</i>	1198	2194	2194	100%	0.0	99%

4.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากหัวข้อที่ 4.3 ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 โดยได้นำมาทำการตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ได้แก่ รูปร่าง ความหนูน สี ขอบ และความมันวาว นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมแกรมและย้อมสปอร์เพื่อดูลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัว และวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรีย แสดงผลดังตารางที่ 4.3

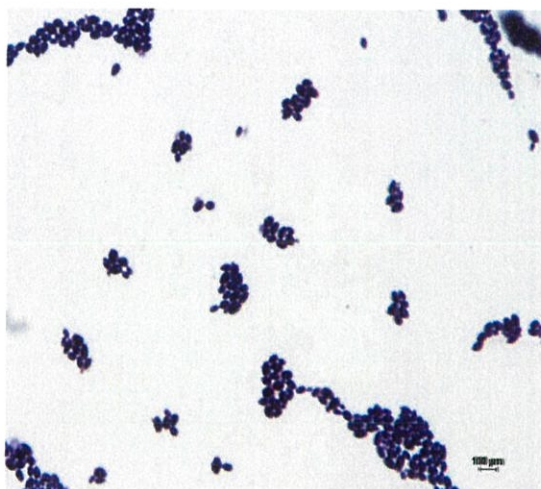
ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย				
		ลักษณะโคโลนี	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างสปอร์	การย้อมแกรม	ขนาดเซลล์ (ไมครอน)
MG3		กลม สีขาว แบนราบติดกับ อาหาร ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้ำมันวาว	กลมและอยู่ ติดกันเป็นกลุ่ม คล้ายพวงองุ่น	ไม่มี	แกรมบวก	3.1
LG1		กลม โค้งนูนจาก ผิวอาหาร เล็กน้อย สีขาว ชุ่ม ขอบโคโลนีเรียบ	กลมและอยู่ ติดกันเป็นกลุ่ม คล้ายพวงองุ่น	ไม่มี	แกรมลบ	2.7

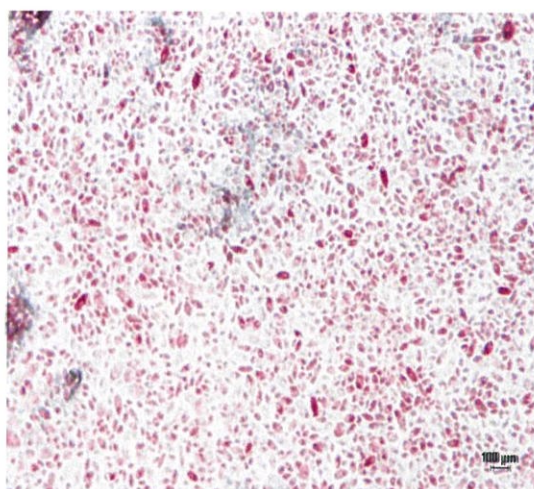
ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย				
		ลักษณะโคโลนี	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างสปอร์	การย้อมแกรม	ขนาดเซลล์ (ไมครอน)
NG6		กลม โค้งนูนจากผิวอาหาร เล็กน้อย สีครีม ชุ่ม ขอบโคโลนีเรียบ ผิวแห้ง	กลมและอยู่ติดกันเป็นกลุ่ม คล้ายพวงองุ่น	ไม่มี	แกรมบวก	2.3
BX1		กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว	ท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	ไม่มี	แกรมลบ	0.7

MG3



ก*

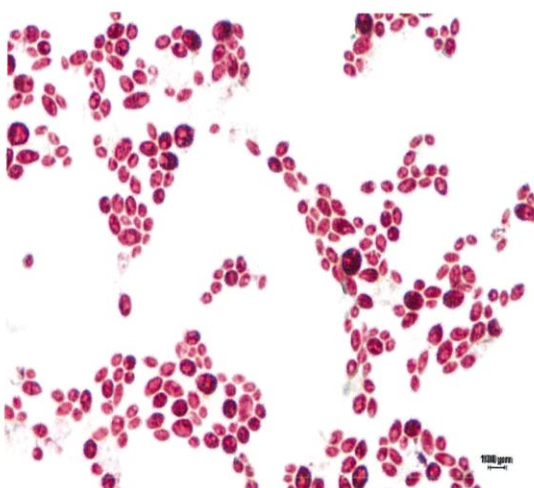


จ*

LG1



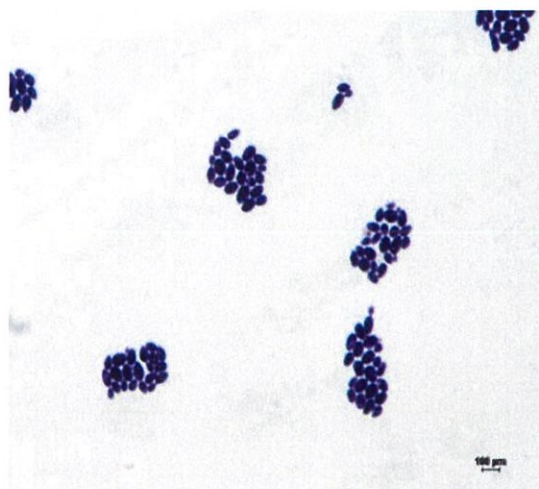
ก



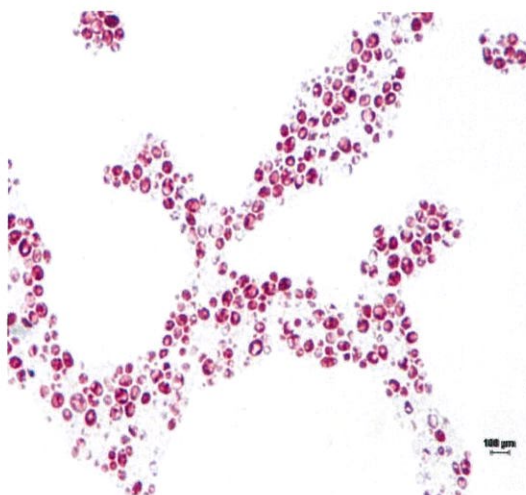
ข

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต MG3 NG6 LG1 และ BX1 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

NG6

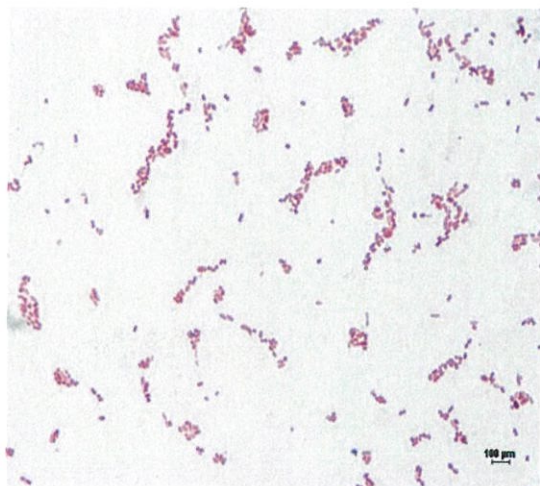


ก

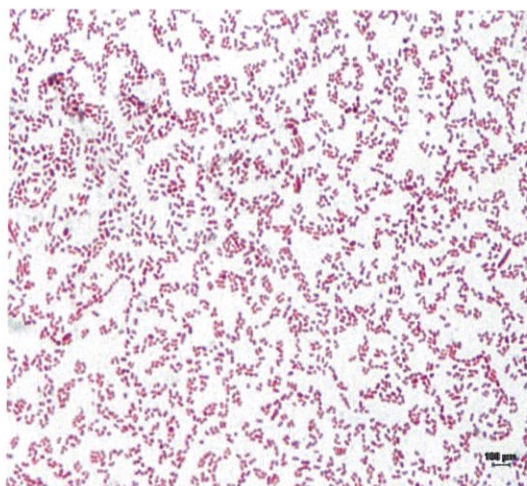


ข

BX1



ก



ข

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต MG3 NG6 LG1 และ BX1
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

หมายเหตุ *ก หมายถึง รูปแสดงลักษณะของการย้อมแกรม
*ข หมายถึง รูปแสดงลักษณะของการย้อมสปอร์

จากรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 โดยทำการตรวจสอบลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งพบว่า ไอโซเลต MG3 มีลักษณะ โคโลนีกลมสีขาว แบนราบติดกับอาหาร โปร่งแสง ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้ามันวาว ไอโซเลต LG1 มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาว โค้งนูนจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย มีความชุ่ม ขอบโคโลนีเรียบ ไอโซเลต NG6 มีลักษณะโคโลนีกลมสีครีม โค้งนูนจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวโคโลนีแห้ง และไอโซเลต BX1 มีลักษณะโคโลนีกลมสีครีม นูน ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้ามันวาว

จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า รูปร่างและการจัดเรียงตัว การสร้างสปอร์ การย้อมแกรม และขนาดเซลล์ (ไมครอน) เมื่อเปรียบเทียบกับตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (Krieg และ Holt, 1984(a)). พบว่า *Staphylococcus* sp. มีลักษณะติดแกรมบวก เซลล์กลม ไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นแบคทีเรีย facultative anaerobe ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับไอโซเลต MG3 และ NG6 ที่ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานมาก่อนหน้านี้ จากการเปรียบเทียบตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.3 (Krieg และ Holt, 1984(c)) รายงานว่า *Pluralibacter gergoviae* มีลักษณะติดแกรมลบ เซลล์รูปท่อน จัดเป็นแบคทีเรีย facultative anaerobe เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ จากลักษณะสัณฐานที่กล่าวมาข้างต้นไม่สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ เพราะเมื่อดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไอโซเลต LG1 เซลล์มีรูปร่างกลมรี และจากการเปรียบเทียบตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (Krieg และ Holt, 1984(a)) รายงานว่า *Acetobacter persici* มีลักษณะติดแกรมลบ เซลล์รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ และต้องการอากาศในการเจริญ พบว่าคล้ายคลึงกับไอโซเลต BX1 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบแกรมของแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงไม่เกิน 18-24 ชั่วโมง และการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมีขนาดของเซลล์ตั้งแต่ 0.7-3.1 ไมครอน

จากการรวบรวมงานวิจัยต่างๆ พบว่า ยังไม่มีงานวิจัยใดที่รายงานเกี่ยวกับการผลิตกรดอะซิติกจาก *Staphylococcus warneri* *Staphylococcus pasteurii* *Pluralibacter gergoviae* หรือกรดมาลิกจาก *Acetobacter persici* แต่พบการรายงานการผลิตกรดอะซิติกหรือกรดมาลิกจากแบคทีเรีย ยีสต์ หรือราชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 4.4 ดังนั้นทั้ง 4 ไอโซเลตจึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาต่อ

ตารางที่ 4.4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิก

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณความเข้มข้น ของกรดที่ผลิตได้ (g/L)	ที่มา
สายพันธุ์ดั้งเดิมที่สามารถผลิตกรดอะดิพิค			
<i>Candida Tropicalis</i> OH23	Glucose และ n-hexadecane	0.64	Okuhara และคณะ (1971)
<i>Arthrobacter</i> สายพันธุ์ BP2	Cyclohexanone	0.05 g/L	Brzostowicz และ คณะ (2003)
สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดอะดิพิค			
<i>E. coli</i> QZ1111 (<i>paaJ/paaH1</i>)	Glucose	0.0007 g/L	Yu และคณะ (2014)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440-CJ103 (<i>aroY/catA</i>)	<i>p</i> -Coumarate	13.5 g/L	Vardon และคณะ (2015)
<i>Escherichia coli</i> WN1/pWN2.248 (<i>aroZ/aroY/catA</i>)	Glucose	36.7	Niu และคณะ (2002)
<i>Candida tropicalis</i> sAA580 (<i>hexS/CPR/CYP450/ADH</i> <i>/FAO/Ald DH</i>)	Coconut oil	50 g/L	Picataggio และ คณะ (2012)
สายพันธุ์ดั้งเดิมที่สามารถผลิตกรดมาลิก			
<i>Aspergillus flavus</i>	Glucose	113	Battat และคณะ (1991)
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Glucose	59	Zelle และคณะ (2008)
<i>Zygosaccharomyces</i> <i>rouxii</i>	Glucose	75	Taing และ Taing (2007)
สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดมาลิก			
<i>Aspergillus oryzae</i> SaMF2103a-68 (<i>pyc/mdh</i>)	Glucose	154	Brown และคณะ (2013)

ตารางที่ 4.4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณความเข้มข้น ของกรดที่ผลิตได้ (g/L)	ที่มา
สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดมาลิก			
<i>Escherichia coli</i> XZ658 (ldhA/ackA/adhE/pflB/ mgsA/poxB /frdBC/ sfcA /maeB /fumB /fumAC)	Glucose	34	Zhang และคณะ (2011)
<i>Escherichia coli</i> WGS-10 (pta/pckA ³)	Glucose	9.25	Moon และคณะ (2008)

4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิก

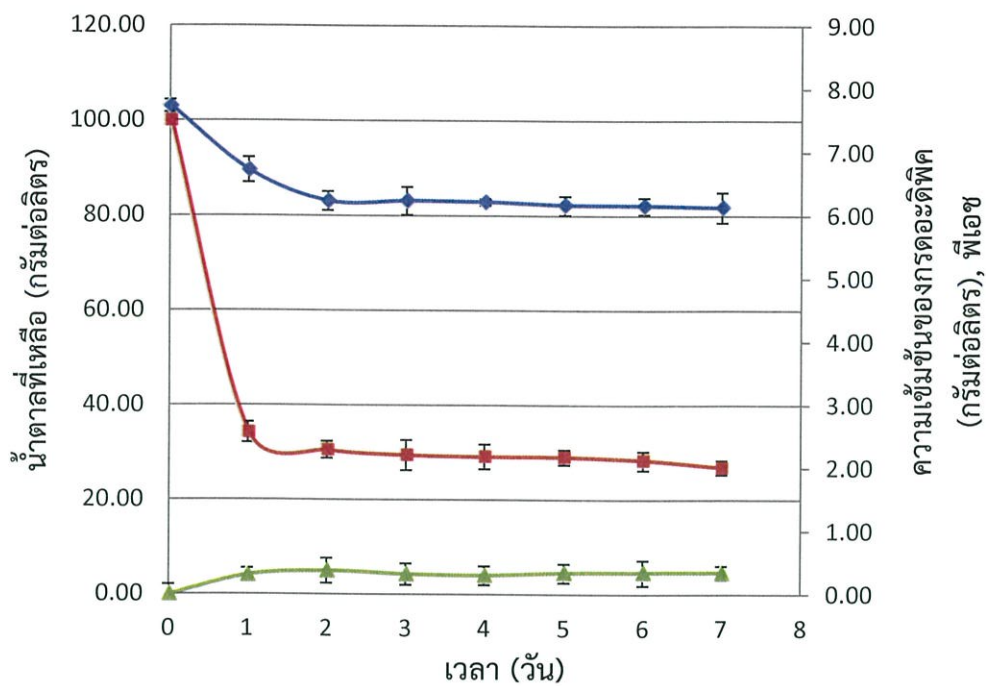
4.5.1 การศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิก

ทำการศึกษาโดยใช้อาหารสูตร Shaker culture ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกันคือ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร โดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เติมหิวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.953 1.042 และ 0.950 ตามลำดับ ไอโซเลต BX1 ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เติมหิวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.027 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ไอโซเลต BX1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่างความเข้มข้นละ 6 มิลลิลิตรต่อวัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน แล้วนำส่วนใสที่กรองได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วย DNS method และตรวจสอบค่าพีเอช ผลการทดลองได้แสดงดังตารางที่ 4.5

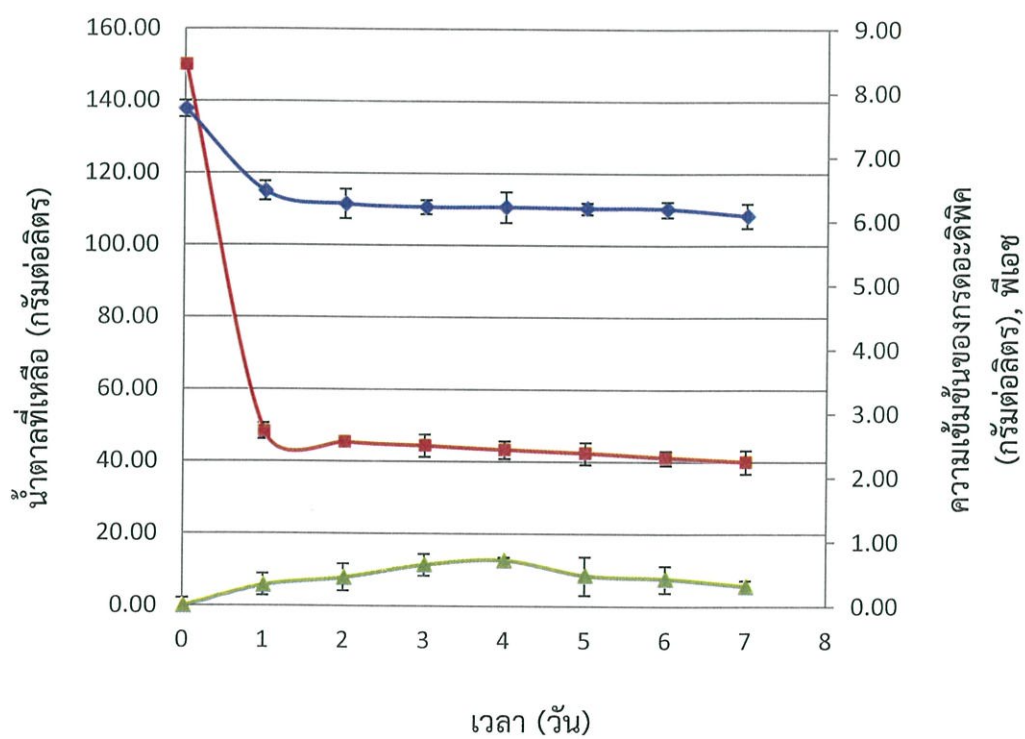
ตารางที่ 4.5 แสดงผลการผลิตกรดอะดิพิคและร้อยละผลได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกัน

Isolate	Condition			Concentration of Adipic acid (g/L)	% Yield
	Carbon Sources (g/L)	Time (day)	Final pH		
MG3	100	7	6.13	0.344 ± 0.112	0.579 ± 0.190
	150	7	6.09	0.312 ± 0.098	0.350 ± 0.102
	200	7	6.12	0.430 ± 0.202	0.353 ± 0.222
	250	7	6.05	0.534 ± 0.176	0.331 ± 0.155
LG1	100	7	5.93	16.758 ± 0.323	23.602 ± 0.263
	150	7	5.65	12.934 ± 0.451	13.081 ± 0.124
	200	7	5.99	6.922 ± 0.202	5.247 ± 0.108
	250	7	5.70	7.848 ± 0.150	4.706 ± 0.332
NG6	100	7	5.87	0.312 ± 0.222	0.506 ± 0.162
	150	7	5.79	0.383 ± 0.154	0.439 ± 0.102
	200	7	5.74	0.311 ± 0.095	0.250 ± 0.028
	250	7	5.76	0.324 ± 0.234	0.216 ± 0.036

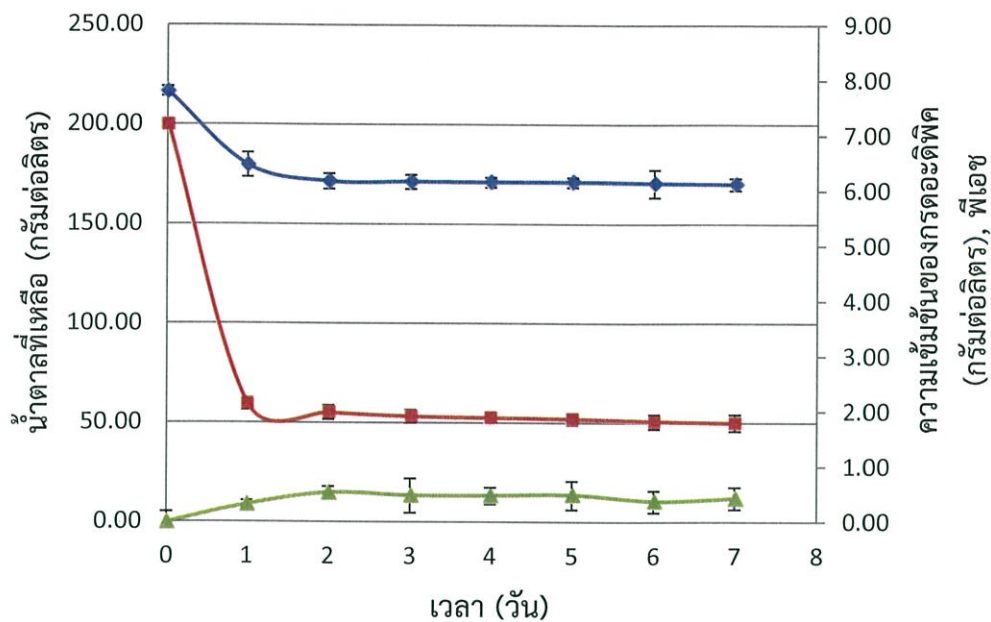
จากตารางที่ 4.5 แสดงผลการผลิตกรดอะดิพิคและร้อยละผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกันคือ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อ-ลิตร นอกจากนี้ยังได้นำผลวิเคราะห์หาคาร์บอนอะดิพิค ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอช เป็นเวลา 7 วัน มาทำการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.2 4.4 และ 4.6 และยังได้แสดงกราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะดิพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ตามแหล่งคาร์บอนปริมาณ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.3 4.5 และ 4.7



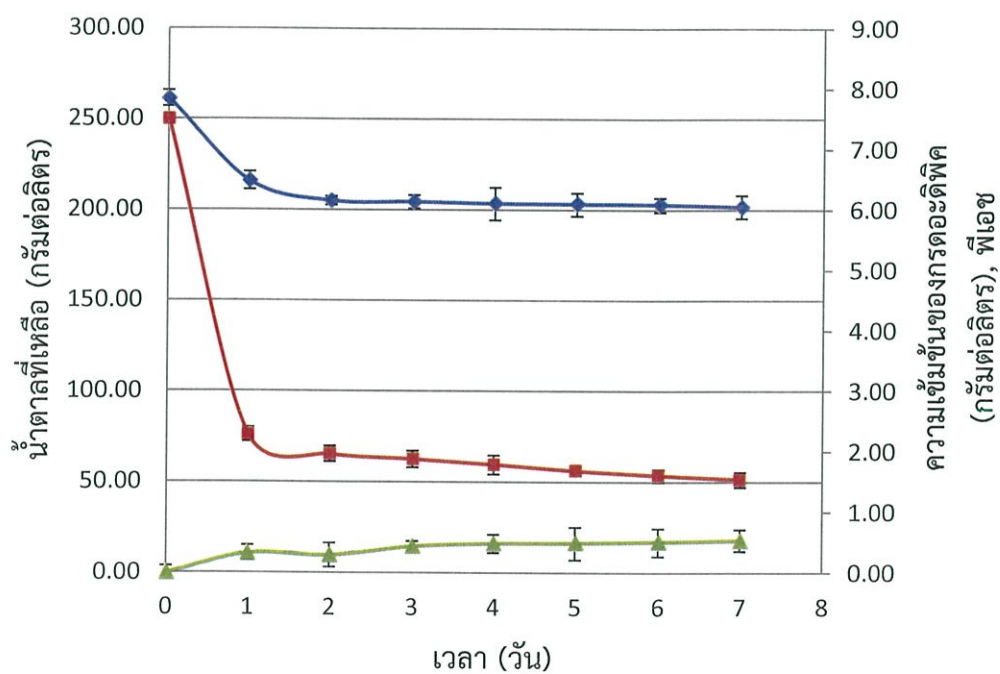
(A)



(B)



(C)



(D)

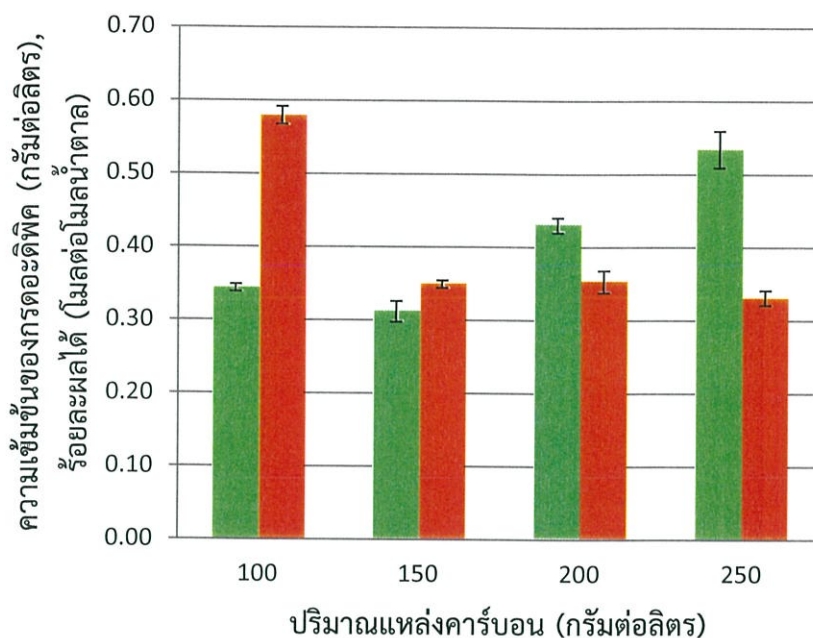
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต MG3 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือน้ำตาลที่เหลือ ▲ คือความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิต ◆ คือพีเอช

จากรูปที่ 4.2(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต MG3 ณ เวลา ต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชเริ่มลดลงจนถึงวันที่ 2 และค่อนข้างคงที่จนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.13 และพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dave และ Patel (2003) ที่กล่าวว่า การลดลงของค่า pH มีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และค่อนข้างคงที่จนวันที่ 7 ผลิตได้ 0.344 ± 0.112 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 26.806 ± 1.502 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.2(B) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่จนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.09 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.707 ± 0.052 กรัมต่อลิตร จากนั้นค่อยๆ ลดลงถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.312 ± 0.098 กรัมต่อลิตร ซึ่งไอโซเลต MG3 อาจมีการหยุดการเจริญเกิดสภาวะเครียดรบกวนจากสภาพแวดล้อมเชื้อไม่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดกับสภาวะที่เกิดขึ้นได้ทำให้เชื้อเข้าสู่สภาวะที่ไม่เจริญเติบโต และตายในที่สุด (Griffith, 2005) เป็นผลให้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกค่อยๆ ลดลง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 39.972 ± 3.224 กรัมต่อลิตร

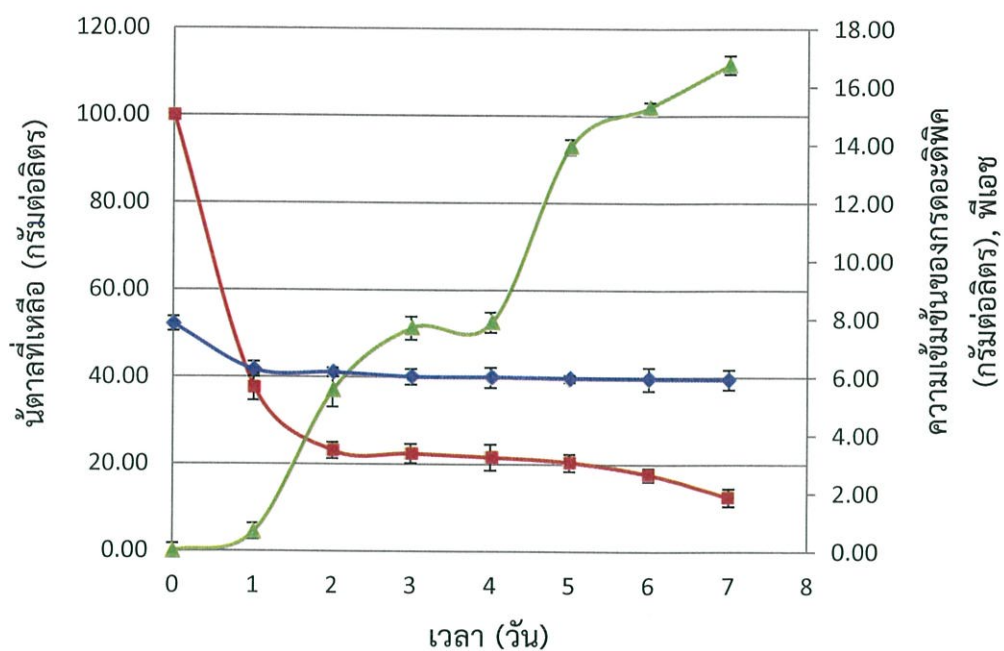
จากรูปที่ 4.2(C) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.12 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 2 และค่อนข้างคงที่จนวันที่ 7 ผลิตได้ 0.430 ± 0.202 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 49.917 ± 4.230 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.2(D) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.05 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.534 ± 0.176 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจน วันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 51.333 ± 4.091 กรัมต่อลิตร

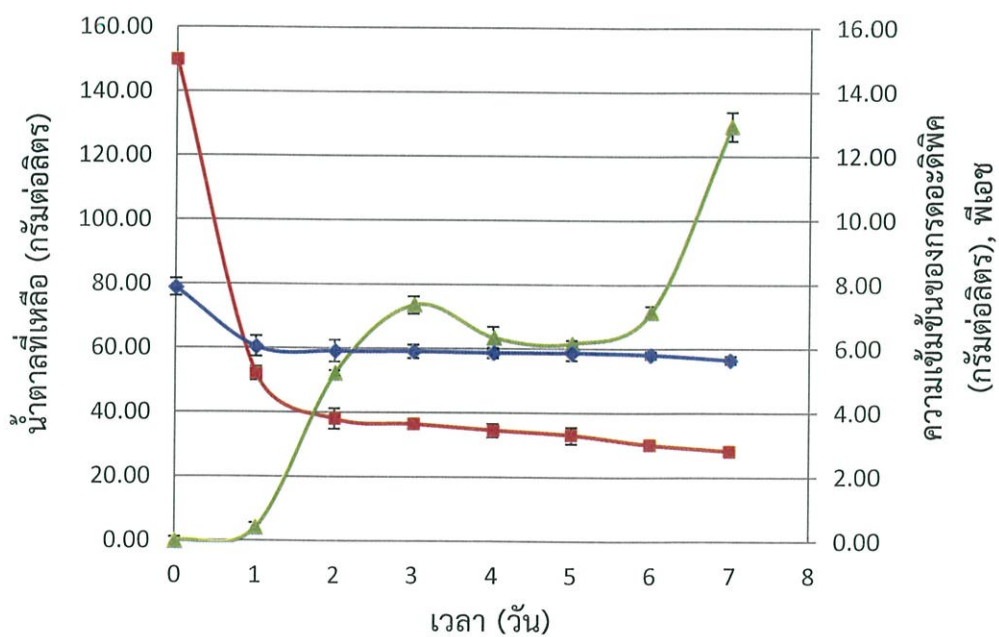


รูปที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต MG3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

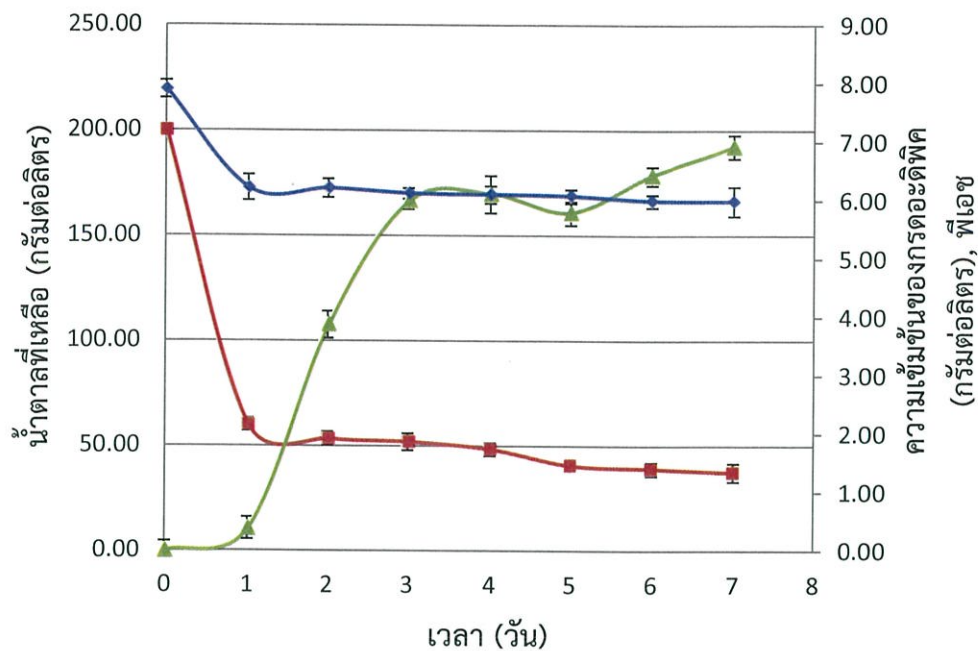
จากรูปที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติก และร้อยละผลได้ของไอโซเลต MG3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต MG3 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 0.534 ± 0.176 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร กลับให้ค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับ 0.579 ± 0.190 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกของไอโซเลต MG3 แม้ว่าที่กลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ร้อยละ 35.58 แต่มีการใช้ความเข้มข้นกลูโคสสูงกว่าถึง 2.5 เท่า ส่งผลให้ค่าร้อยละผลได้ (%Yield) ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกรดอะซิติกพบว่า ได้ความเข้มข้นที่สูงกว่างานวิจัยของ Cheng และคณะ (2000) ที่รายงานว่า *E. coli* สายพันธุ์กลาย สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ 0.2-0.4 กรัมต่อลิตร โดยใช้กลูโคสและไซโคลเฮกซานอล เป็นแหล่งคาร์บอน



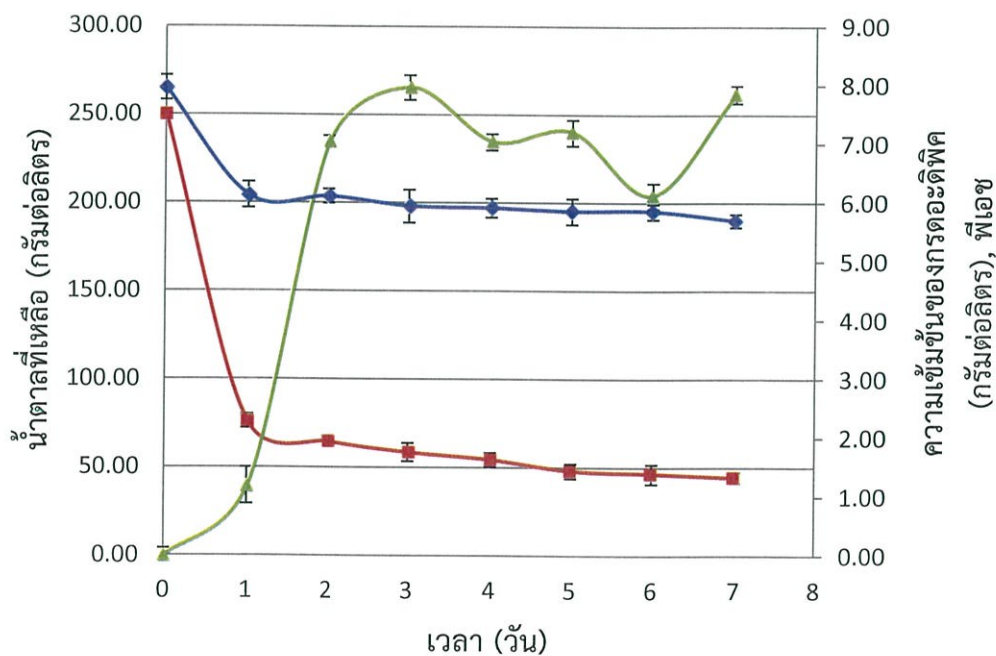
(A)



(B)



(C)



(D)

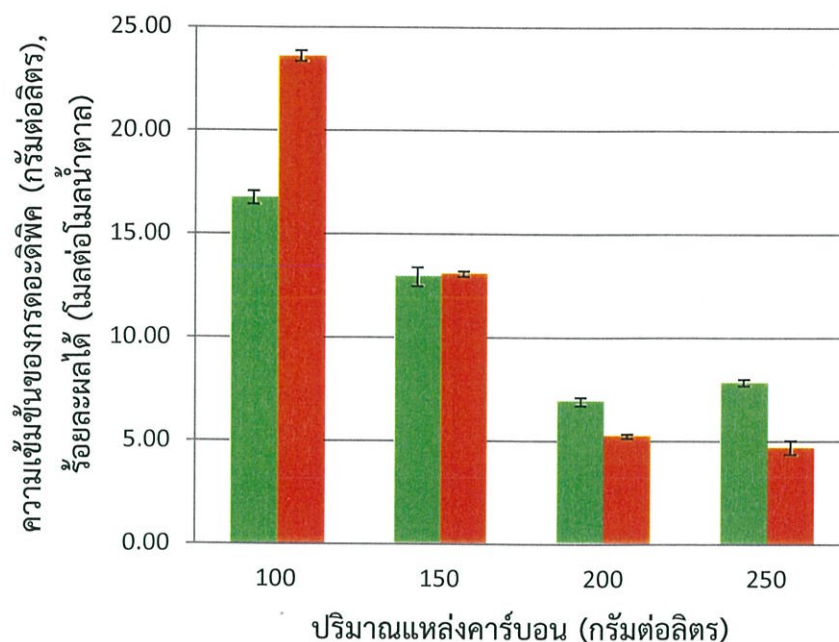
รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดิฟิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต LG1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือน้ำตาลที่เหลือ ▲ คือความเข้มข้นของกรดอะดิฟิคที่ผลิต ◆ คือพีเอช

จากรูปที่ 4.4(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต LG1 ณ เวลา ต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.93 และความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนวันที่ 7 ผลิตได้เท่ากับ 16.758 ± 0.323 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 12.472 ± 2.121 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.4(B) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.65 และความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนวันที่ 7 ผลิตได้เท่ากับ 12.934 ± 0.451 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็ว ณ วันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 28.111 ± 1.374 กรัมต่อลิตร

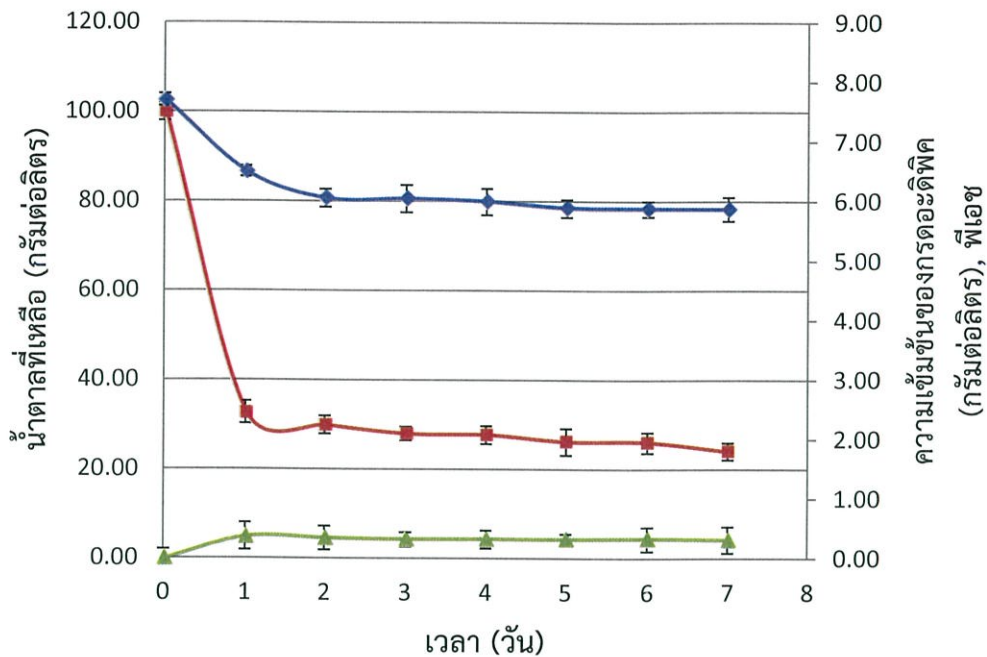
จากรูปที่ 4.4(C) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.99 และความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนวันที่ 7 ผลิตได้เท่ากับ 6.922 ± 0.202 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 37.361 ± 4.362 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.4(D) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.70 และความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ผลิตได้ 7.848 ± 0.150 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลืออยู่ 44.389 ± 3.060 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma และคณะ (2013) ที่รายงานว่า ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอาจจะเกิดจากไอโซเลต LG1 นำน้ำตาลไปใช้ในการสร้างกรดอะดีพิคและสารเมตาบอไรต์ต่างๆ และใช้ในการเจริญ

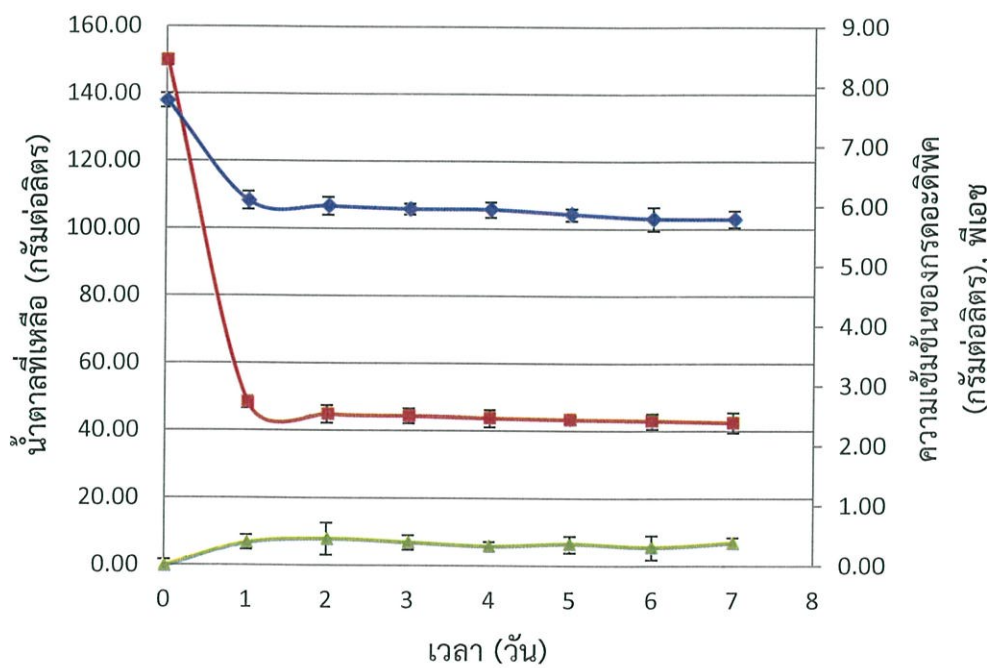


รูปที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดิพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต LG1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะดิพิคที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

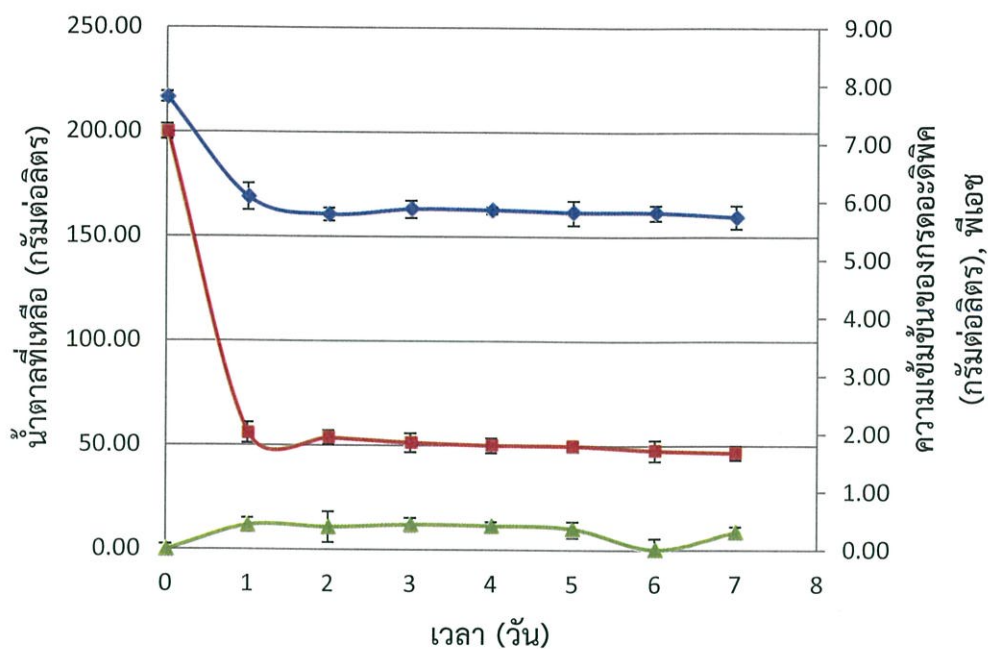
จากรูปที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดิพิค และร้อยละผลได้ของไอโซเลต LG1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต LG1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต LG1 สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้สูงสุด 16.768 ± 0.323 กรัมต่อลิตร และมีค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับ 23.603 ± 0.263 โมลต่อโมลน้ำตาล เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกรดอะดิพิคที่ผลิตได้พบว่าได้ความเข้มข้นที่สูงกว่างานวิจัยของ Okuhara และคณะ (1971) ที่รายงานว่า *C. tropicalis* OH23 สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้ความเข้มข้น 0.64 กรัมต่อลิตร โดยใช้กลูโคสและ n-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคของไอโซเลต LG1



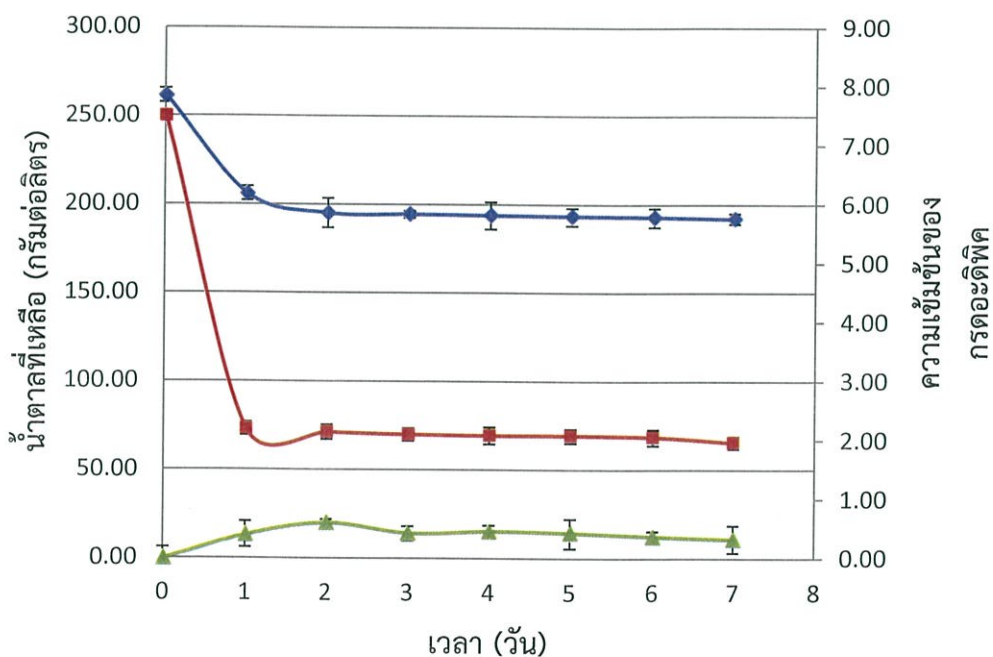
(A)



(B)



(C)



(D)

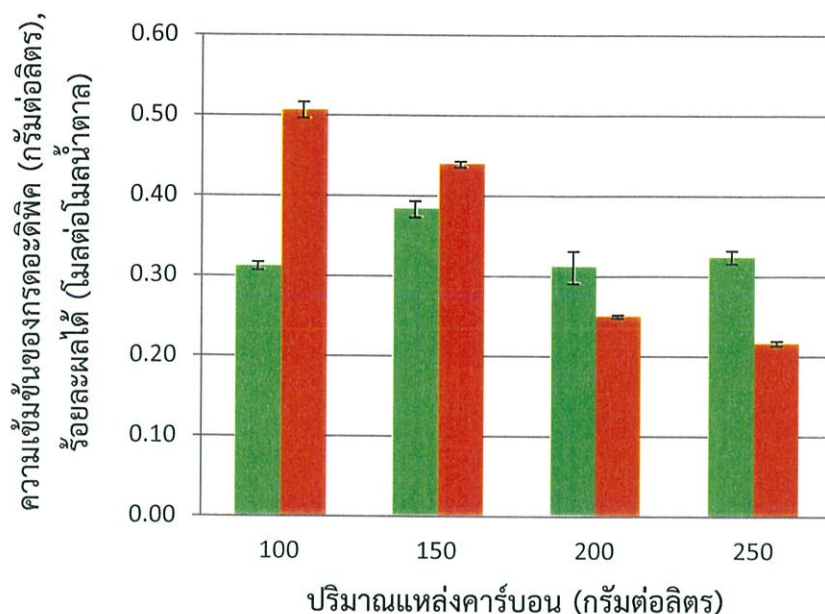
รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต NG6 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือน้ำตาลที่เหลือ ▲ คือความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิต ♦ คือพีเอช

จากรูปที่ 4.6(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต NG6 ณ เวลา ต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.87 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.312 ± 0.222 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 24.028 ± 1.900 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.6(B) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.79 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.383 ± 0.154 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 42.472 ± 2.986 กรัมต่อลิตร

จากรูป 4.6(C) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.74 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.311 ± 0.095 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 46.583 ± 3.331 กรัมต่อลิตร

จากรูป 4.6(D) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.76 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.324 ± 0.234 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นใน ชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 เหลือกลูโคสอยู่ 65.417 ± 3.454 กรัมต่อลิตร



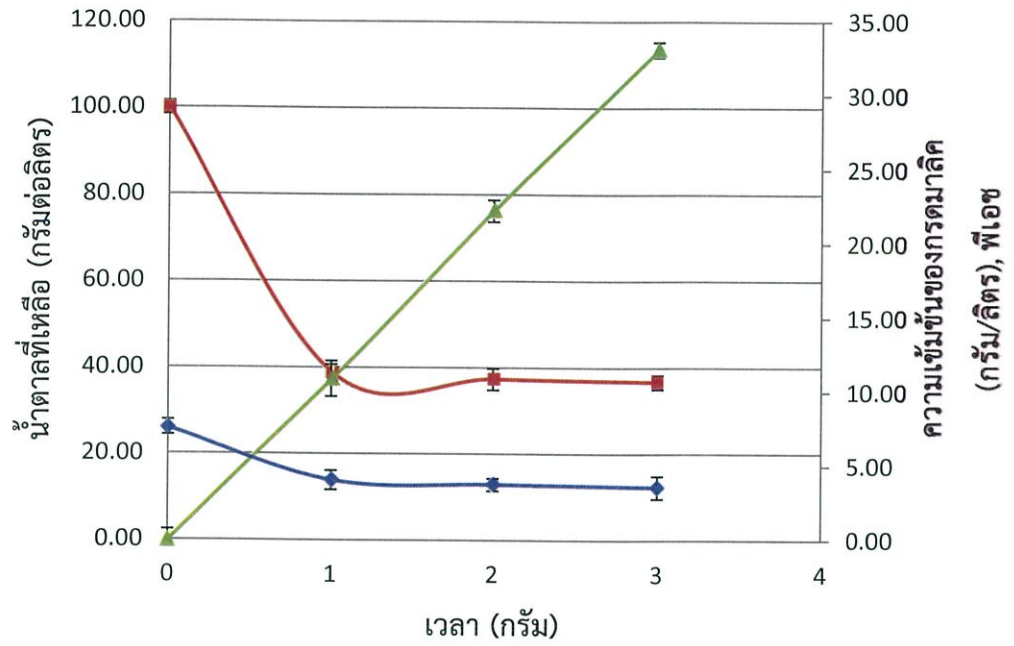
รูปที่ 4.7 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต NG6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

จากรูปที่ 4.7 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติก และร้อยละผลได้ของไอโซเลต NG6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร จากงานวิจัยของ Yu และคณะ (2014) ได้ทำการทดลองผลิตกรดอะซิติกโดยอาศัยเชื้อ *E. coli* AA1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายได้ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 639 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่จากผลการทดลองนี้ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต NG6 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต NG6 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 0.383 ± 0.154 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร กลับให้ค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับ 0.506 ± 0.162 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกของไอโซเลต NG6 แม้ว่าที่กลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ร้อยละ 18.58 แต่มีการใช้ความเข้มข้นกลูโคสสูงกว่าถึง 1.5 เท่า ส่งผลให้ค่าร้อยละผลได้ (%Yield) ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด นอกจากนี้พบว่างานวิจัยของ Yu และคณะ (2014) รายงานว่าการผลิตอะซิเตตโดยตรงจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส จะได้ค่าไตเตอร์ (titer) หรือความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ต่ำมาก

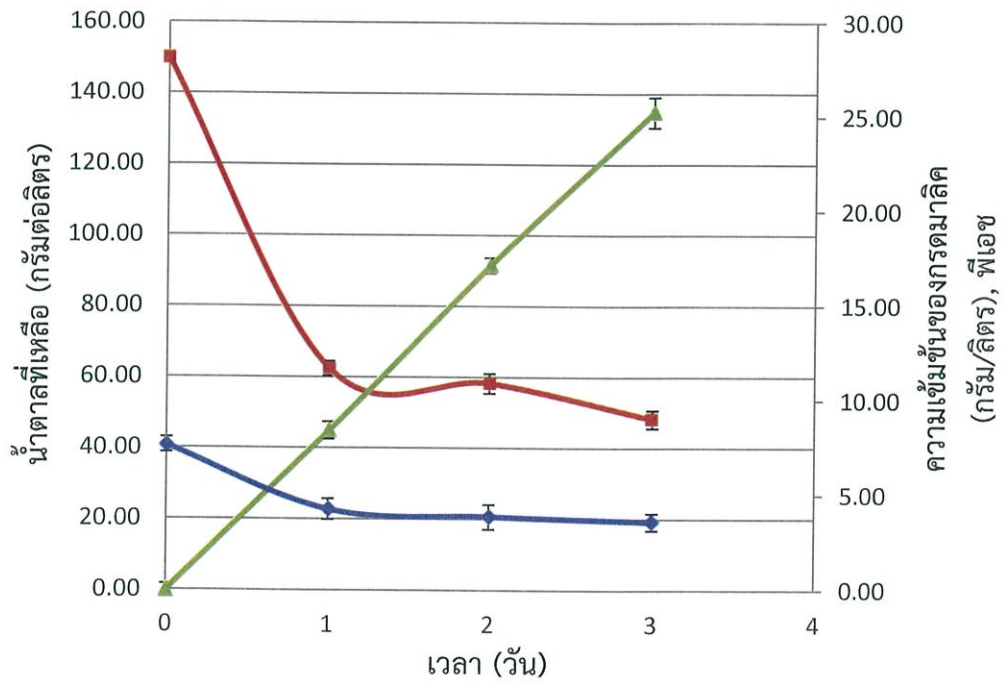
ตารางที่ 4.6 แสดงผลการผลิตกรดมาลิกและร้อยละผลได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1
ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกัน

Isolate	Condition			Concentration of Malic acid (g/L)	% Yield
	Carbon Sources (g/L)	Time (day)	Final pH		
BX1	100	3	3.57	33.104 ± 0.501	29.250 ± 0.057
	150	3	3.60	25.259 ± 0.806	13.878 ± 0.443
	200	3	3.72	18.124 ± 0.448	7.437 ± 0.184
	250	3	3.90	12.461 ± 0.240	4.166 ± 0.119

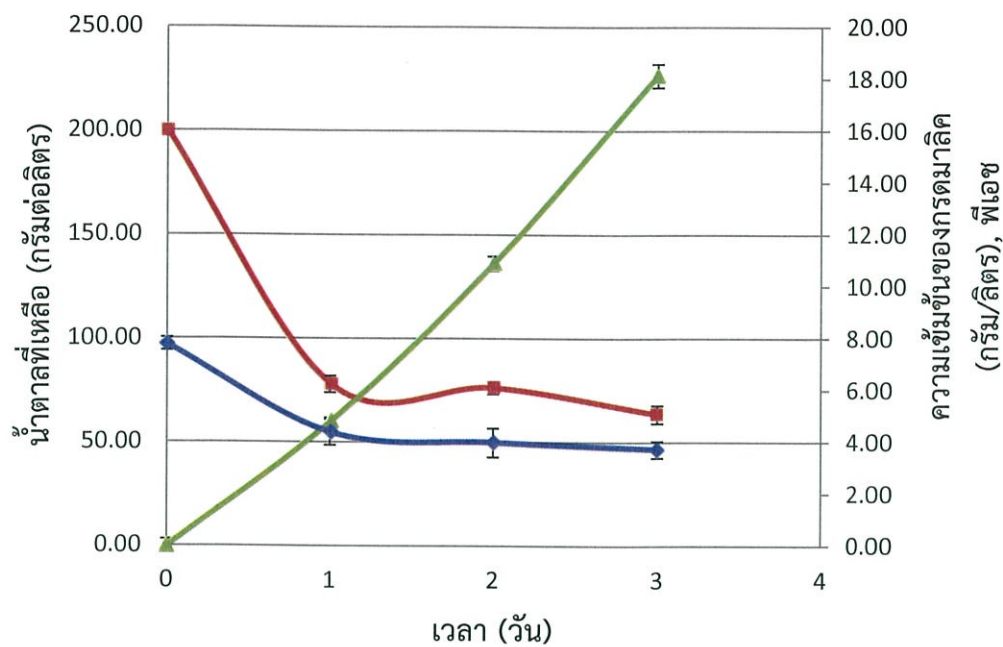
จากตารางที่ 4.6 แสดงผลการผลิตกรดมาลิก และร้อยละผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1 ในแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณแตกต่างกันคือ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้นำผลวิเคราะห์หากรดมาลิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอช เป็นเวลา 3 วัน มาทำการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.8 และยังได้แสดงกราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ตามแหล่งคาร์บอนปริมาณ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.9



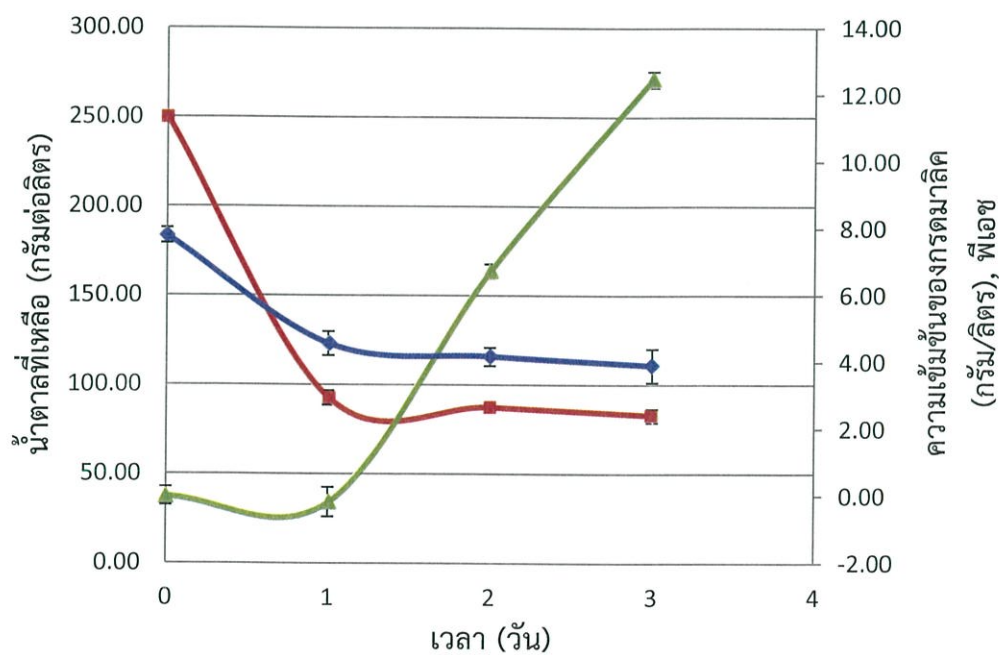
(A)



(B)



(C)



(D)

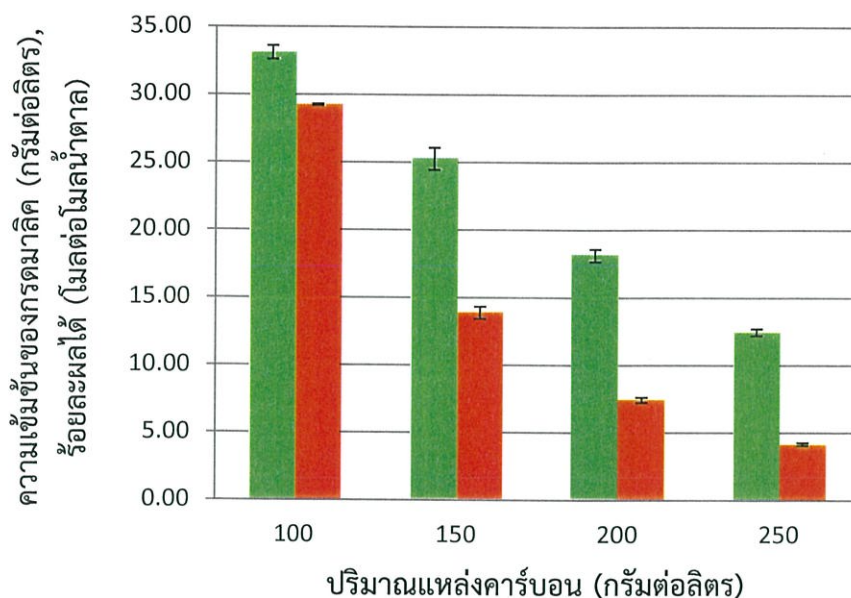
รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของมาลิกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต BX1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือน้ำตาลที่เหลือ ▲ คือความเข้มข้นของกรดอะดิพิคที่ผลิต ◆ คือพีเอช

จากรูปที่ 4.8(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต BX1 ณ เวลา ต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลง อย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.57 และความเข้มข้นของกรดมาลิก ที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนวันที่ 3 ผลิตได้ 33.104 ± 0.501 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และลดลงจนวันที่ 3 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 36.643 ± 1.603 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.8(B) พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลง อย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.60 และความเข้มข้นของกรด มาลิกที่ผลิตได้ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนวันที่ 3 ผลิตได้ 25.259 ± 0.806 กรัมต่อลิตร ขณะที่ ปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ ค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 48.107 ± 2.542 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.8(C) พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลง อย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.72 และความเข้มข้นของ กรดมาลิกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนวันที่ 3 ผลิตได้ 18.124 ± 0.448 กรัมต่อลิตร ขณะที่ ปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ ค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 63.571 ± 4.330 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.8(D) พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลง อย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.90 และความเข้มข้นของ กรดมาลิกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนวันที่ 3 ผลิตได้ 12.461 ± 0.240 กรัมต่อลิตร ขณะที่ ปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ ค่อยๆลดลงจนวันที่ 3 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 82.571 ± 3.751 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.9 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต BX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

จากรูปที่ 4.9 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิก และร้อยละผลได้ของไอโซเลต BX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต BX1 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงสุด 33.104 ± 0.501 กรัมต่อลิตร และมีค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับร้อยละ 29.250 ± 0.057 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกของไอโซเลต BX1

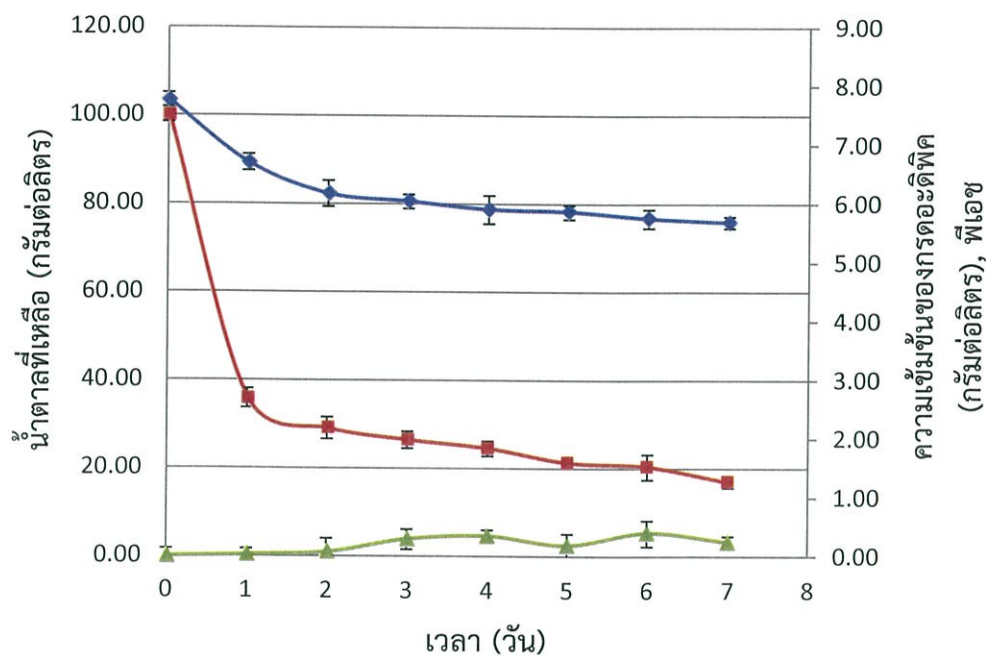
4.5.2 การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิก

เมื่อทราบปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาต่อ โดยใช้อาหารสูตร Shaker culture medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามการทดลองในหัวข้อ 4.5.1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณแตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.997 1.035 และ 0.950 ตามลำดับ ไอโซเลต BX1 ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.030 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ไอโซเลต BX1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยง โดยไอโซเลต MG3 LG1 NG6 และ BX1 เก็บตัวอย่างความเข้มข้นละ 6 มิลลิลิตรต่อวัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน แล้วนำส่วนใสที่กรองได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกด้วยเครื่อง HPLC ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วย DNS method และตรวจสอบค่าพีเอช ผลการทดลองได้แสดงดังตารางที่ 4.7

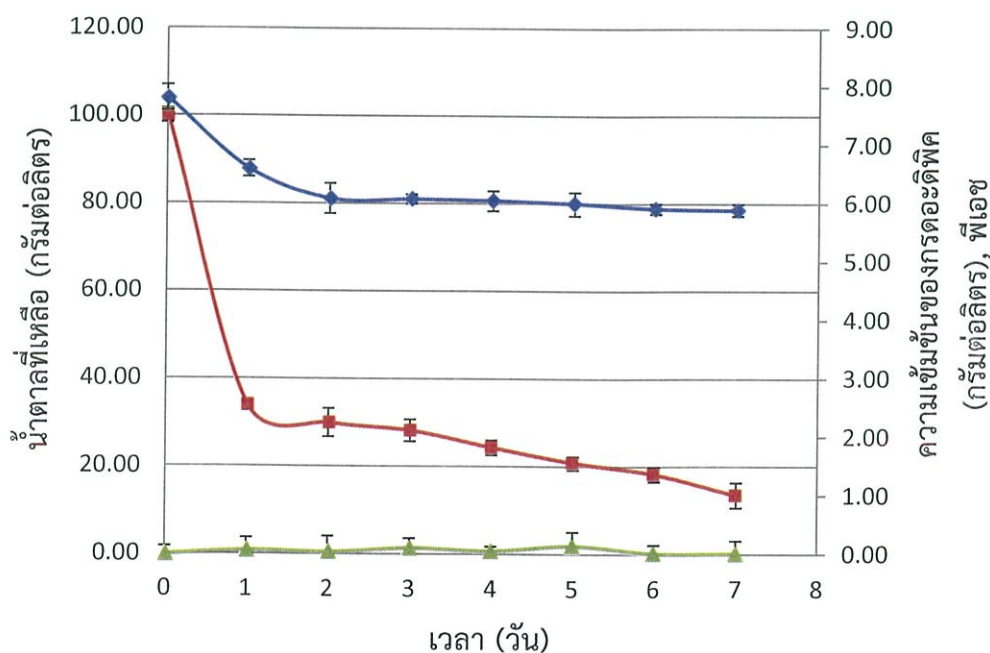
ตารางที่ 4.7 แสดงผลการผลิตกรดอะดิพิคและร้อยละผลได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ในแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีปริมาณแตกต่างกัน

Isolate	Condition				Concentration of Adipic acid (g/L)	% Yield
	Carbon Sources (g/L)	CaCO ₃ (g/L)	Time (day)	Final pH		
MG3	100	10	7	5.69	0.245 ± 0.090	0.364 ± 0.154
		20	7	5.91	0.012 ± 0.222	0.017 ± 0.123
		30	7	5.88	0.440 ± 0.104	0.629 ± 0.117
LG1	100	10	7	5.29	3.425 ± 0.054	4.916 ± 0.077
		20	7	5.27	9.768 ± 0.118	14.359 ± 0.173
		30	7	5.31	15.695 ± 0.254	21.994 ± 0.356
NG6	100	10	7	6.84	0.048 ± 0.138	0.089 ± 0.199
		20	7	7.47	0.047 ± 0.111	0.090 ± 0.058
		30	7	7.35	0.049 ± 0.170	0.092 ± 0.076

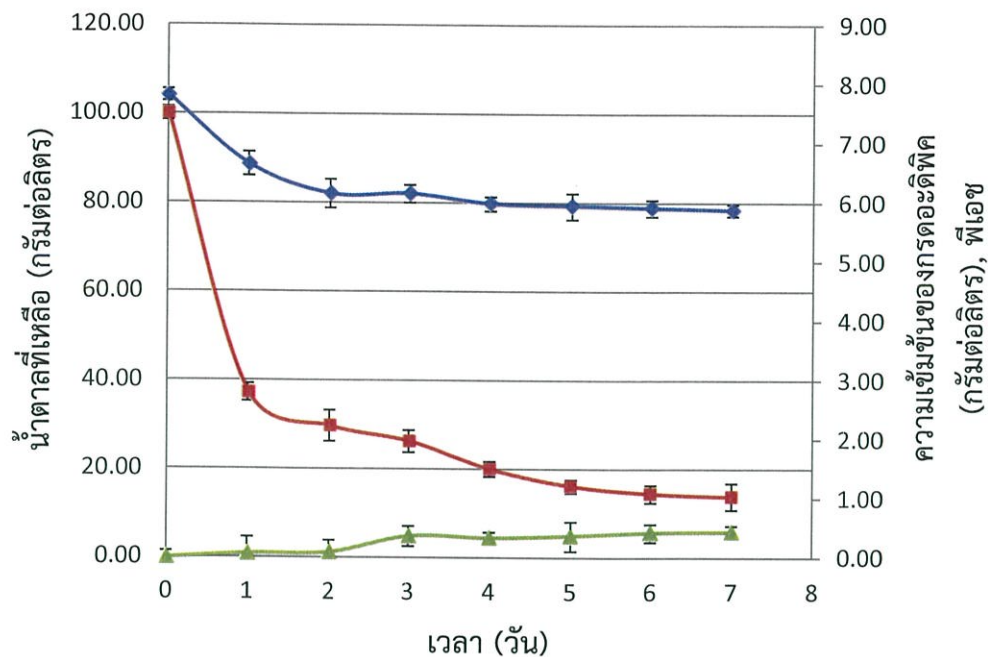
จากตารางที่ 4.7 แสดงผลการผลิตกรดอะดีพิค และร้อยละผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 โดยใช้กลูโคสปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้นำผลวิเคราะห์หากรดอะดีพิค ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอช เป็นเวลา 7 วัน มาทำการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.10 4.12 และ 4.14 และยังได้แสดงกราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ตามแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.11 4.13 และ 4.15



(A)



(B)



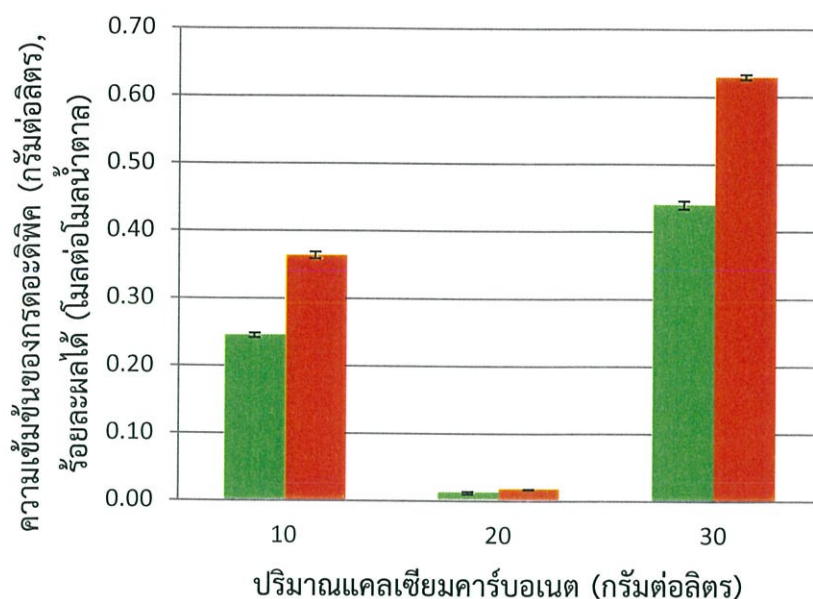
(C)

รูปที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิค ที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต MG3 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือน้ำตาลที่เหลือ ▲ คือความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิต ◆ คือพีเอช

จากรูปที่ 4.10(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต MG3 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 และลดลงตามลำดับจนถึงวันที่ 7 มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.69 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 และค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.245 ± 0.090 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 16.94 ± 1.282 กรัมต่อลิตร โดยจากงานวิจัยของ Zambanini และคณะ (2016) รายงานว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้เป็นสารปรับเสถียรในการรักษาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *Ustilago trichophora* สายพันธุ์ TZ1 ในการผลิตกรดมาลิก โดยพบว่า ถ้าไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อยๆลดลงในระหว่างการเพาะเลี้ยงถึง 4.5 แต่ถ้ามีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกรักษาไว้ที่ 6.0 ในระหว่างการหมัก และประโยชน์อีกประการของการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือจะเป็นตัวให้คาร์บอนไดออกไซด์แก่ไฟรูเวตในการผลิตมาเลต ผ่านกระบวนการ pyruvate carboxylation-oxaloacetate reduction pathway ซึ่งไฟรูเวตจะเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตตและมาเลตตามลำดับ นอกจากนี้การผลิตกรดมาลิกโดย *Ustilago trichophora* สายพันธุ์ TZ1 โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะเกิดไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ซึ่งจะช่วยเอนไซม์ pyruvate carboxylase ในการสร้างออกซาโลอะซิเตตจากไฟรูเวต

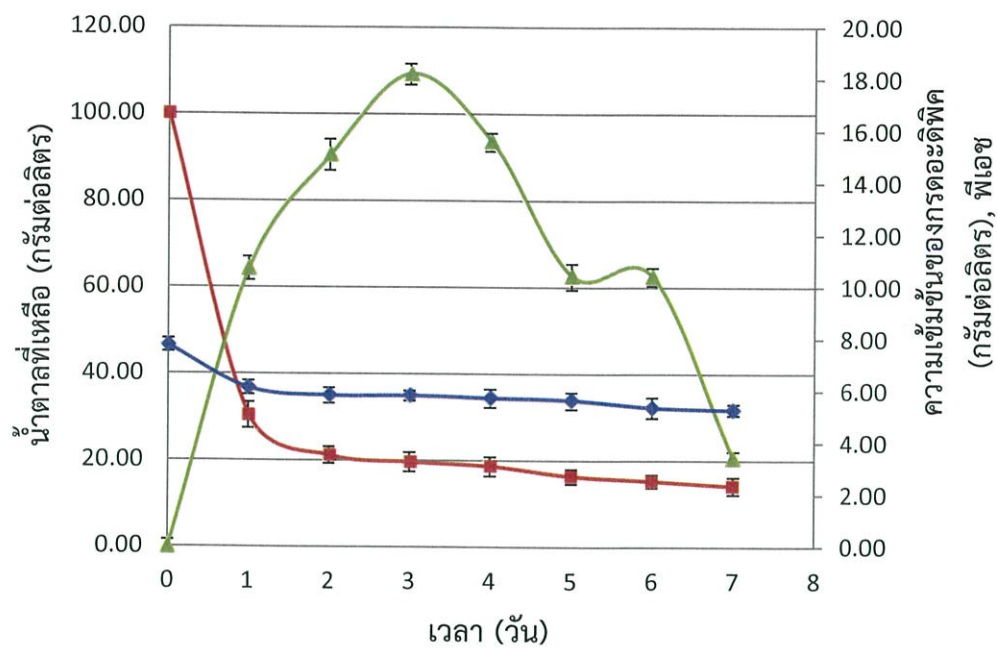
จากรูปที่ 4.10(B) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.89 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.012 ± 0.222 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 13.50 ± 2.873 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.10(C) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.88 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 0.440 ± 0.104 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 13.81 ± 3.001 กรัมต่อลิตร

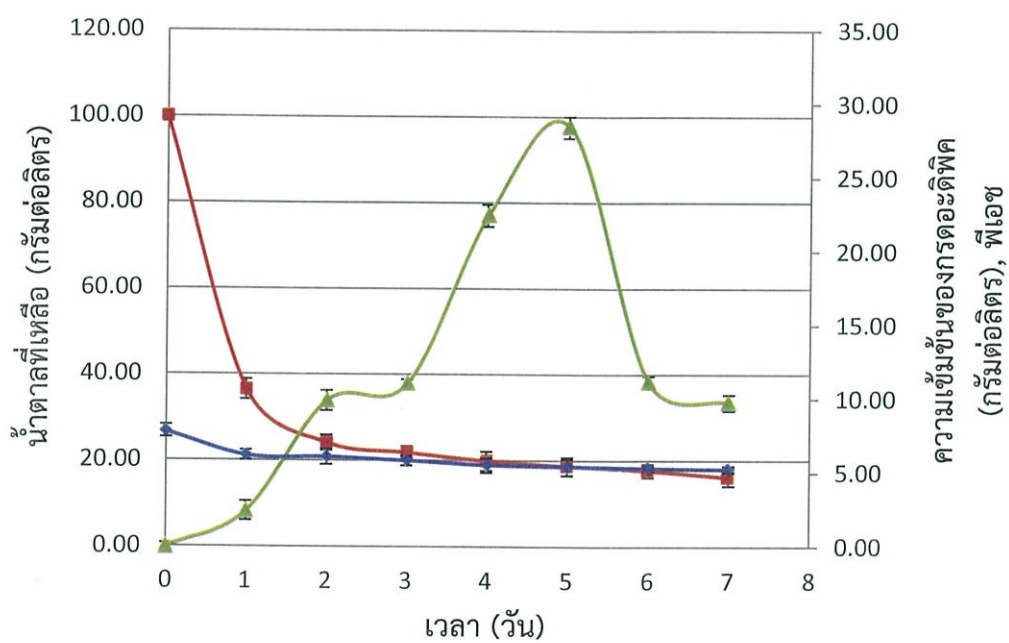


รูปที่ 4.11 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดิพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต MG3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะดิพิคที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

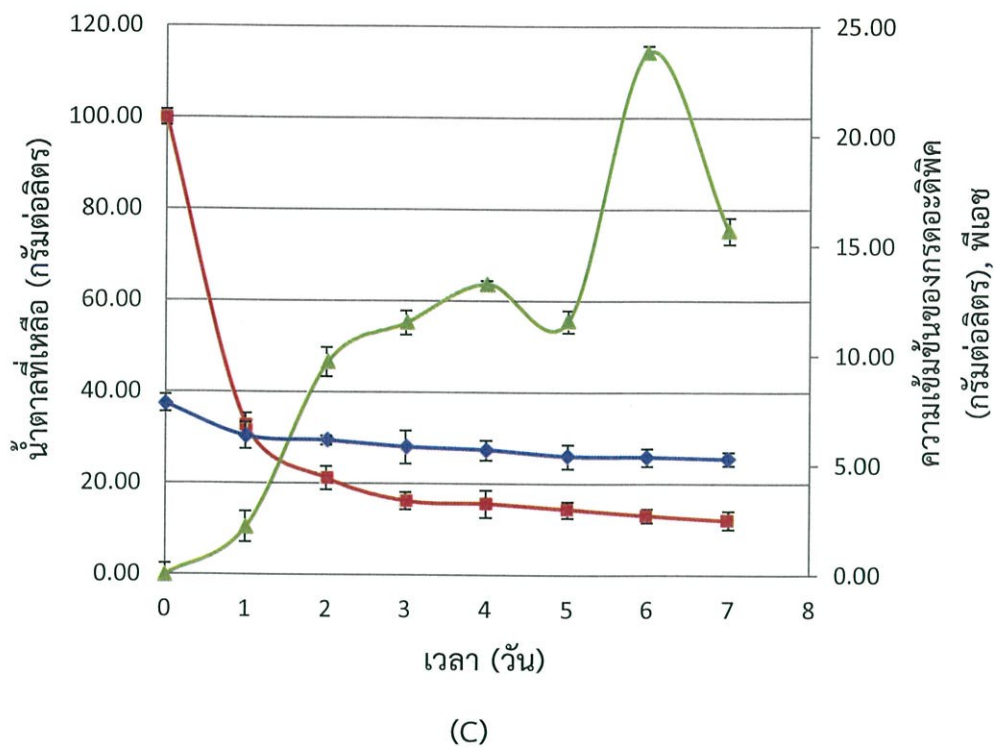
จากรูปที่ 4.11 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดิพิค และร้อยละผลได้ของไอโซเลต MG3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต MG3 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต MG3 สามารถผลิตกรดอะดิพิคได้สูงสุด 0.440 ± 0.104 กรัมต่อลิตรและมีค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.629 ± 0.117 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดิพิคให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยไอโซเลต MG3



(A)



(B)

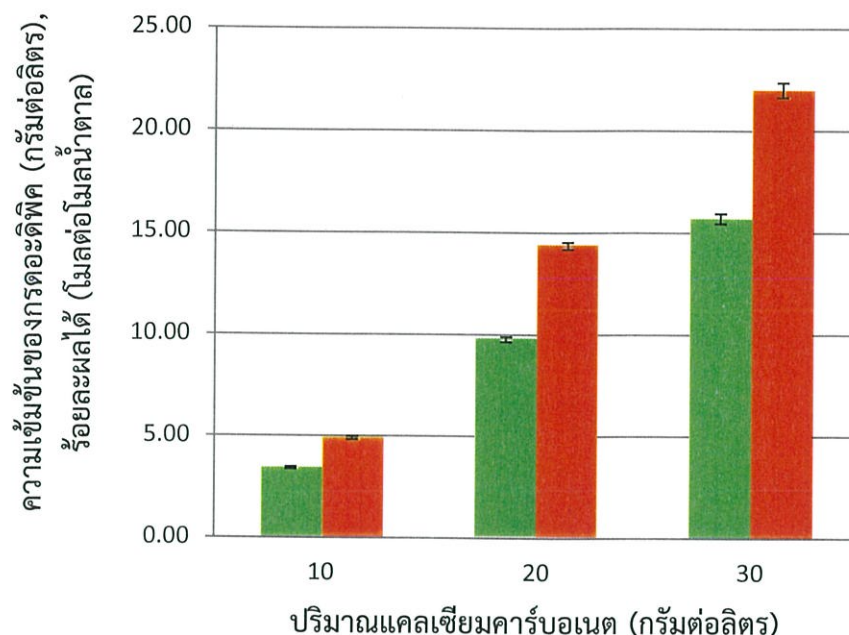


รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติก ที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต LG1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือน้ำตาลที่เหลือ ▲ คือความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิต ◆ คือพีเอช

จากรูปที่ 4.12(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิต พีเอชของไอโซเลต LG1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.29 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มสูงในวันที่ 3 ผลิตได้ 18.194 ± 0.404 กรัมต่อลิตร และค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 7 ผลิตได้ 3.425 ± 0.054 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงโม่งที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 14.11 ± 2.004 กรัมต่อลิตร

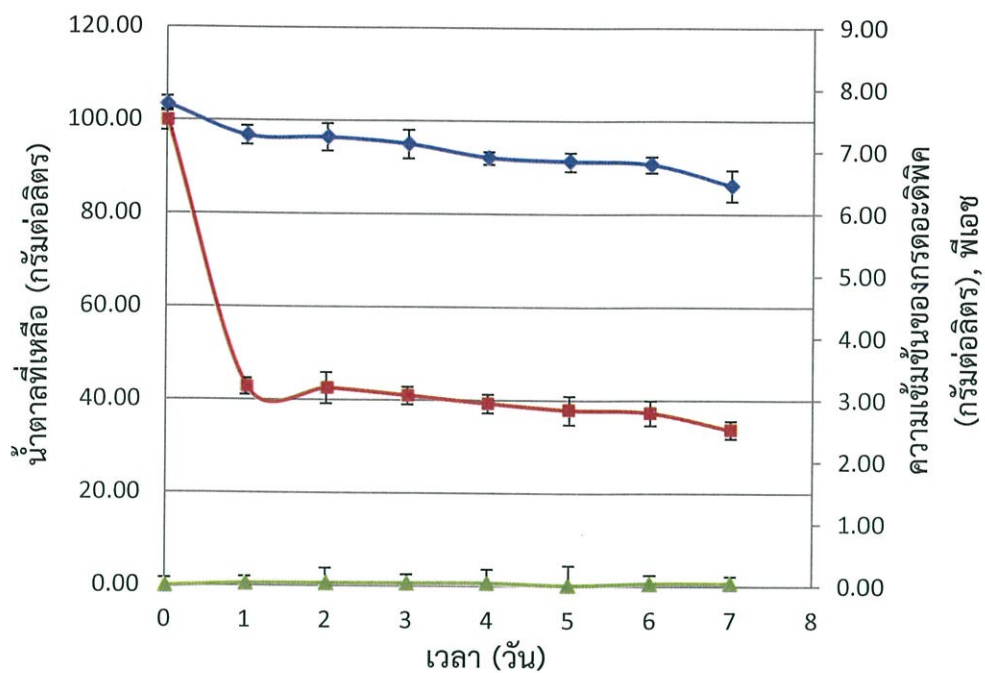
จากรูปที่ 4.12(B) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.27 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้สูงสุดในวันที่ 5 ผลิตได้ 28.437 ± 0.723 กรัมต่อลิตร และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ผลิตได้ 9.768 ± 0.118 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงโม่งที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 16.14 ± 2.012 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.12(C) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.31 และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้สูงสุดในวันที่ 6 ผลิตได้ 23.808 ± 0.321 กรัมต่อลิตร และลดลงจนวันที่ 7 ผลิตได้ 15.695 ± 0.254 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงโม่งที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 12.03 ± 2.145 กรัมต่อลิตร

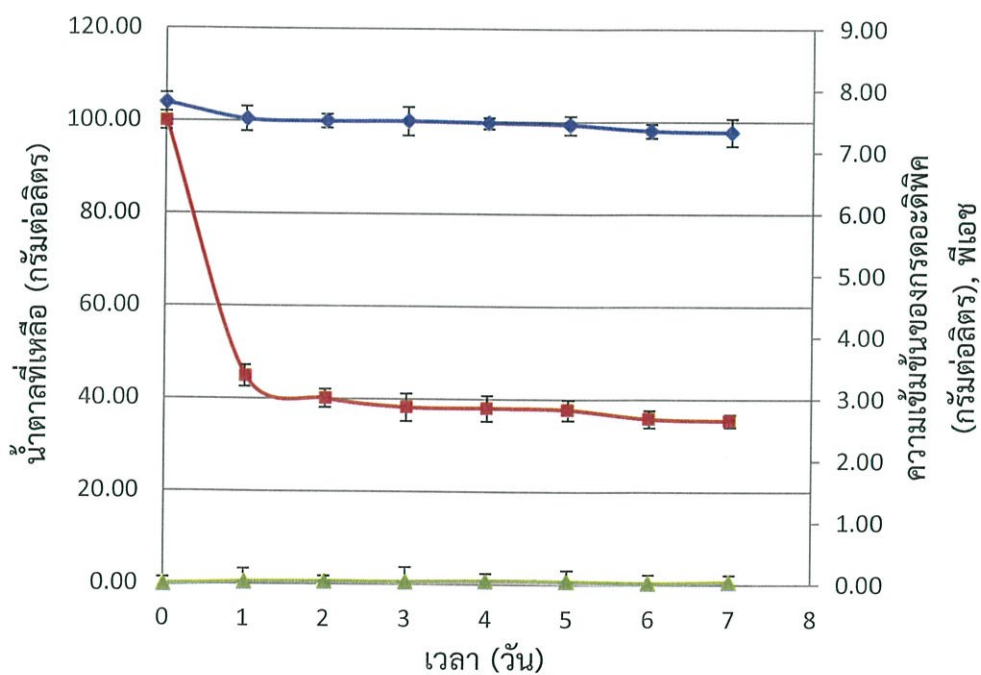


รูปที่ 4.13 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต LG1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

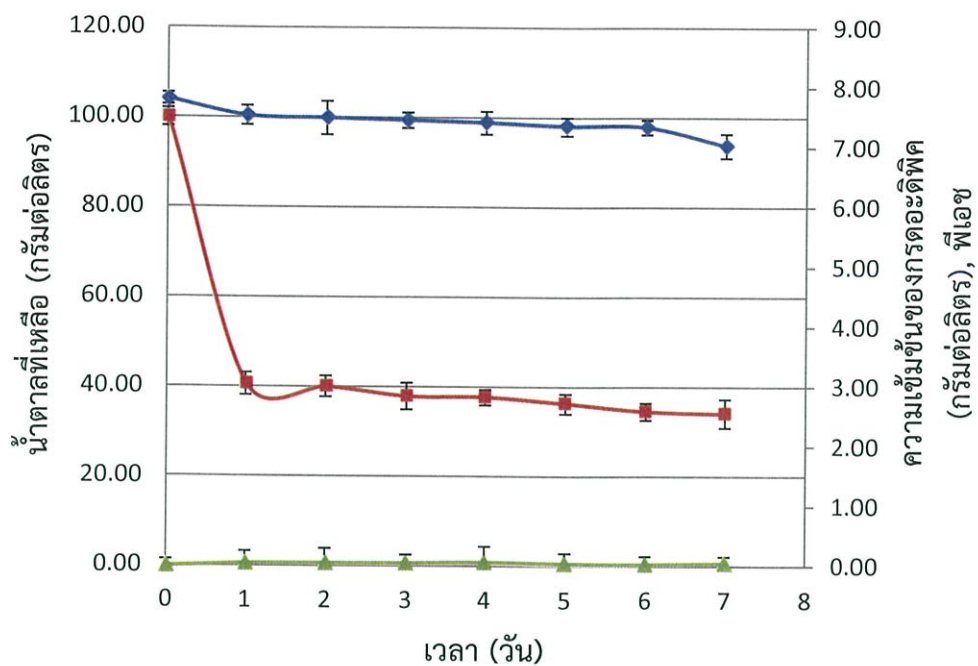
จากรูปที่ 4.13 แสดงความเข้มข้นของกรดอะซิติก และร้อยละผลได้ของไอโซเลต LG1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต LG1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต LG1 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 15.695 ± 0.254 กรัมต่อลิตรและมีค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับร้อยละ 21.914 ± 0.356 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยไอโซเลต LG1



(A)



(B)



(C)

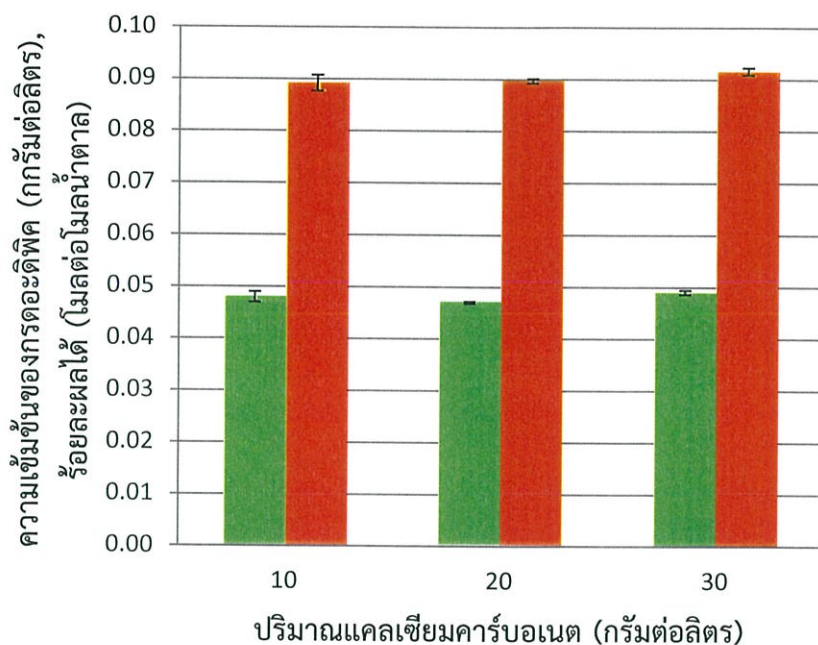
รูปที่ 4.14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติก ที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต NG6 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร

โดย ■ คือ น้ำตาลที่เหลือ ▲ คือ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิต ◆ คือ พีเอช

จากรูปที่ 4.14(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต NG6 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องจนวันที่ 7 มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.46 ความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้น้อยมากจนวันที่ 7 ผลิตได้ 0.048 ± 0.138 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 33.67 ± 1.921 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.14(B) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงเล็กน้อยจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.33 และความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้น้อยมากจนวันที่ 7 ผลิตได้ 0.047 ± 0.111 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 35.39 ± 1.327 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.14(C) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงเล็กน้อยจนวันที่ 7 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.03 และความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้น้อยมากจนวันที่ 7 ผลิตได้ 0.049 ± 0.170 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 7 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 34.08 ± 3.203 กรัมต่อลิตร



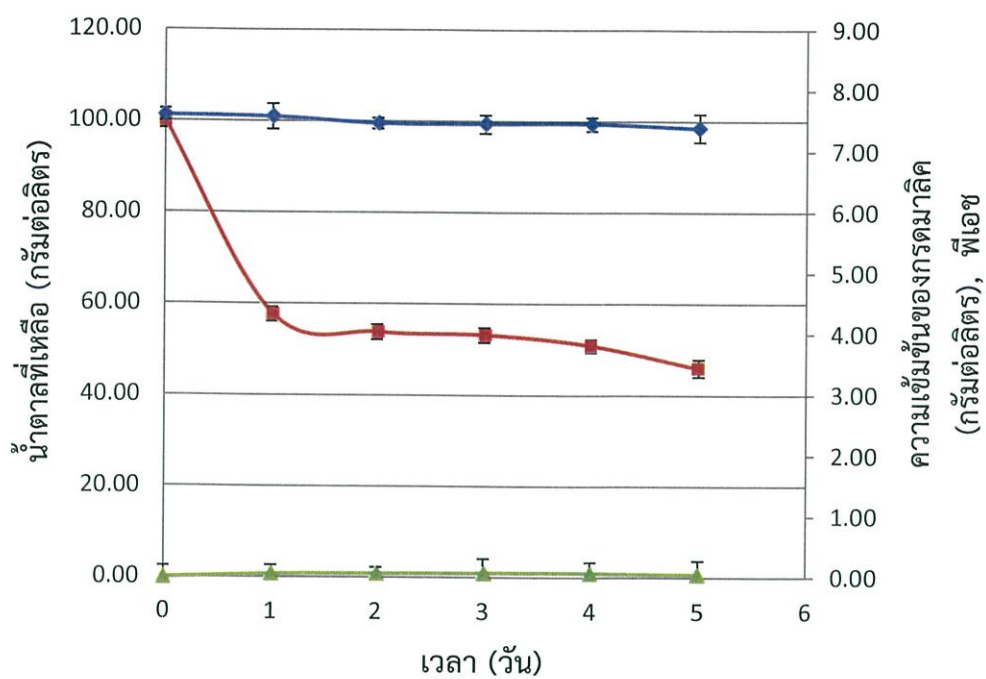
รูปที่ 4.15 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต NG6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะดีพิคที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

จากรูปที่ 4.15 แสดงความเข้มข้นของกรดอะดีพิค และร้อยละผลได้ของไอโซเลต NG6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต NG6 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต NG6 สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้สูงสุด 0.049 ± 0.170 กรัมต่อลิตรและมีค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.092 ± 0.076 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิคให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยไอโซเลต NG6

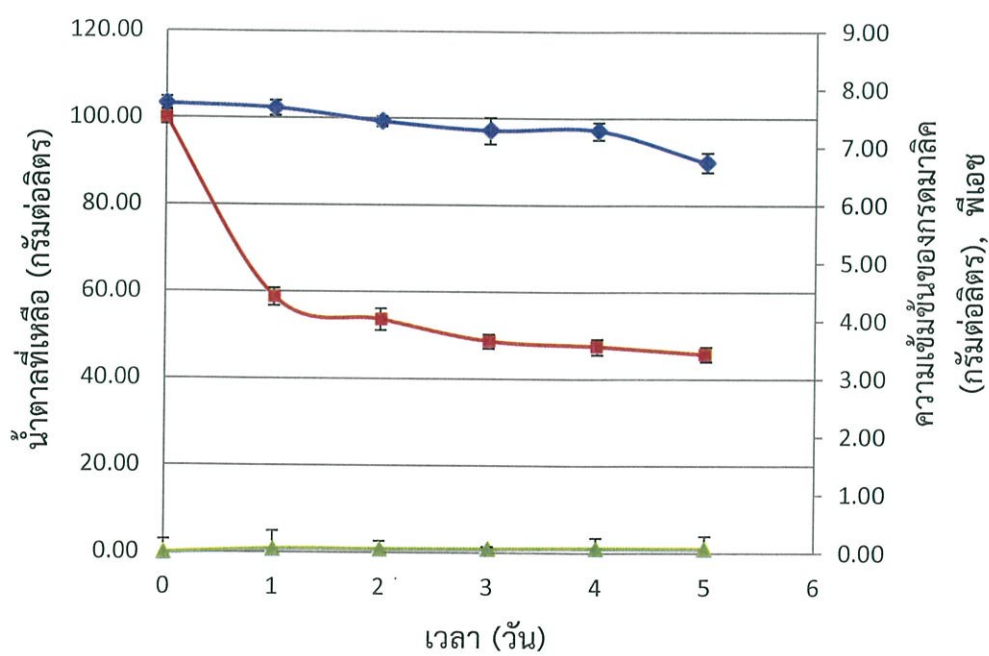
ตารางที่ 4.8 แสดงผลการผลิตกรดมาลิกและร้อยละผลได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1
ในแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีปริมาณแตกต่างกัน

Isolate	Condition				Concentration of Malic acid (g/L)	% Yield
	Carbon Sources (g/L)	CaCO ₃ (g/L)	Time (day)	Final pH		
BX1	100	10	5	7.39	0.047 ± 0.232	0.049 ± 0.364
		20	5	7.28	0.070 ± 0.222	0.072 ± 0.251
		30	5	7.65	0.105 ± 0.168	0.113 ± 0.101

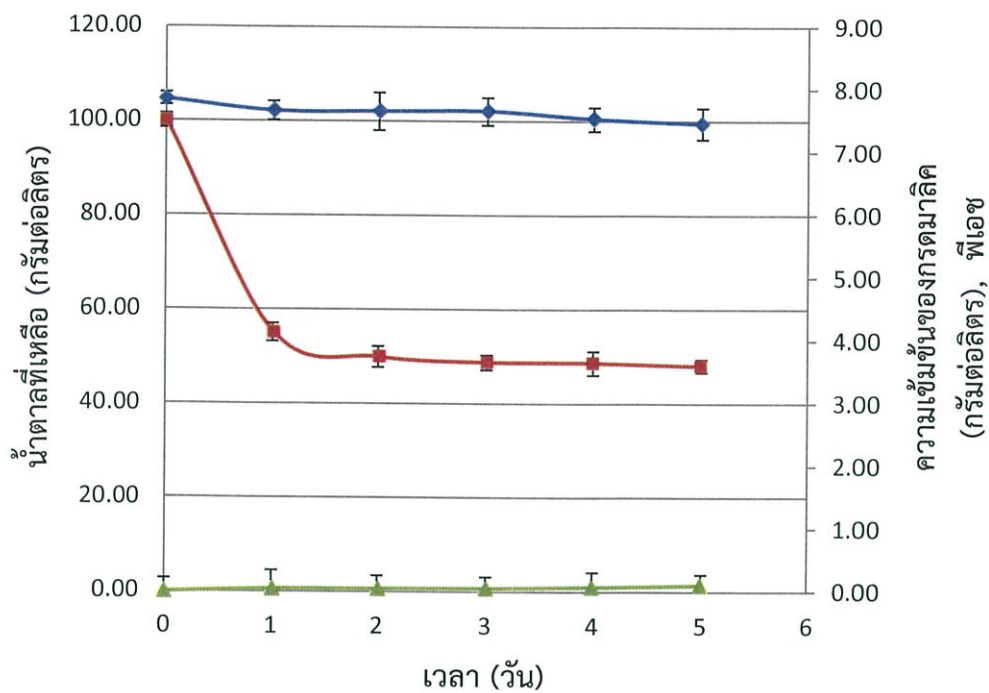
จากตารางที่ 4.8 แสดงผลการผลิตกรดมาลิก และร้อยละผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1 โดยใช้ไซโลสปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้นำผลวิเคราะห์หากรดมาลิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอช เป็นเวลา 5 วัน มาทำการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.16 และยังได้แสดงกราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้และร้อยละผลได้ตามแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.17



(A)



(B)



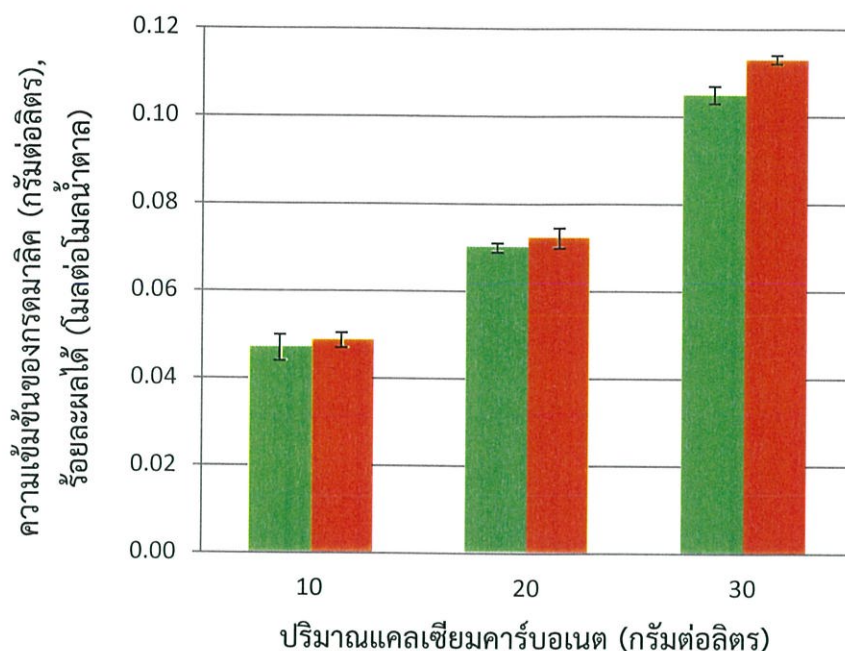
(C)

รูปที่ 4.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรตมาลิก ที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต BX1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน คือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร
โดย ■ คือ น้ำตาลที่เหลือ ▲ คือ ความเข้มข้นของกรตอะดิพิคที่ผลิต ◆ คือ พีเอช

จากรูปที่ 4.16(A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ พีเอชของไอโซเลต BX1 ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงเล็กน้อยจนวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.39 ความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้น้อยมากจนวันที่ 5 ผลิตได้ 0.047 ± 0.232 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 45.93 ± 1.902 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.16(B) พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องจนวันที่ 5 มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.74 และความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้น้อยมากจนวันที่ 5 ผลิตได้ 0.070 ± 0.222 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 5 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 45.71 ± 1.714 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.16(C) พบว่าที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องจนวันที่ 5 มีค่าพีเอชลดลงเล็กน้อยจนวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.46 และความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้จนวันที่ 5 ผลิตได้ 0.105 ± 0.168 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นในช่วงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนวันที่ 5 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 48.04 ± 1.362 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.17 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิกที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต BX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือความเข้มข้นกรดอะดิพิคที่ผลิตได้ ■ คือร้อยละผลได้

จากรูปที่ 4.17 แสดงความเข้มข้นของกรดมาลิก และร้อยละผลได้ของไอโซเลต BX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต BX1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต BX1 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงสุด 0.105 ± 0.168 กรัมต่อลิตรและมีค่าร้อยละผลได้ (%Yield) สูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.113 ± 0.101 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังนั้นในการศึกษานี้ พบว่าความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกให้มีความเข้มข้นสูงโดยไอโซเลต BX1

ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อไอโซเลต MG3 LG1 และ NG6 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และไอโซเลต BX1 ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกสูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Battat และคณะ (1990) ที่เพาะเลี้ยง *A. flavus* สายพันธุ์ A-114 โดยใช้ไซโลสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในการเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นสารปรับเสถียรในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนตจาก 65 กรัมต่อลิตร เป็น 90 กรัมต่อลิตร โดยจากการศึกษาพบว่าจะได้ความเข้มข้นของกรดมาลิกสูงขึ้นจาก 77 กรัมต่อลิตรเป็น 113 กรัมต่อลิตร จากการใช้น้ำตาลกลูโคส 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตอาจเป็นเหตุที่ทำให้ค่าผลิตภาพเพิ่มขึ้นจาก 0.41 เป็น 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยพบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นตัวให้คาร์บอนไดออกไซด์แก่ไฟรูเวตและจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตตและมาเลตตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตที่สามารถสังเคราะห์กรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกได้ พบว่าไอโซเลต MG3 มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus warneri* ร้อยละ 96 ไอโซเลต LG1 มีความคล้ายคลึงกับ *Pluralibacter gergoviae* ร้อยละ 99 ไอโซเลต NG6 มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus* sp. ร้อยละ 78 และไอโซเลต BX1 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter persici* ร้อยละ 99

2) จากการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนและปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก พบว่าไอโซเลต MG3 สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้สูงสุด 0.344 ± 0.112 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต LG1 สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้สูงสุด 16.758 ± 0.323 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร ไอโซเลต NG6 สามารถผลิตกรดอะดีพิคได้สูงสุด 0.312 ± 0.222 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร และไอโซเลต BX1 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงสุด 33.104 ± 0.501 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณไซโลส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) จากการทดลองในการศึกษาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกได้สูงพบว่าเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิกสูงกว่าเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการศึกษาต่อไปอาจเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตให้สูงขึ้น

2) ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตกรดอะดีพิคหรือกรดมาลิก เช่น แหล่งไนโตรเจน ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และอัตราการให้อากาศ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2558. Adipic acid. [Online].
Available : <http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?VID=88>.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2558. Malic acid. [Online].
Available : <http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?VID=1606>
- นীরนุช ช่างทอง, กนก รัตนะกนกชัย, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, รัตติยา แวนนุกูล, ภัทรา ผาสอน, และ สมพิศ สอนโยธา. 2557. “การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้สูงจากน้ำตาลไซโลส.” *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*. 17(3) : 5-12.
- ปัทมสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า. 2557. “การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิคจากแหล่งธรรมชาติ” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมบัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.
- ปิ่นสุรางค์ ดิวังษ์. 2555. “ความหลากหลายและความทนต่อแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรียในดินปนเปื้อนโลหะ.” *วารสารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 1 : 3-4.
- Alcaniz-Monge, J. and Trautwein, G. 2014. “Influence of peroxometallic intermediaries present on polyoxometalates nanoparticles surface on the adipic acid synthesis.” *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 394 : 211-216.
- Alini, S. Basile, F. Blasioli, S. Rinaldi, C. and Vaccari, A. 2007. “Development of new catalysts for N₂O-decomposition from adipic acid plant.” *Applied Catalysis B: Environmental*. 70(1-4) : 323-329.
- Arner, R.J. Prabhu, K.S. and Reddy, C.C. 2004. “Molecular cloning, expression, and characterization of myo-inositol oxygenase from mouse, rat, and human kidney.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 324 : 1386-1392.
- Aydogan, C. Karakoç, V. and Denizli, A. 2015. “Chiral ligand-exchange separation and determination of malic acid enantiomers in apple juice by open-tubular capillary electrochromatography.” *Food Chemistry*. 187 : 130-134.
- Babua, T. Yuna, E.J. Kima, S. Kima, D.H. Liub, K.H. Kimc, S.R. and Kima, K.H. 2015. “Engineering *Escherichia coli* for the production of adipic acid through the reversed-oxidation pathway.” *Process Biochemistry*. 89 : 124-128.
- Battat, E. Peleg, Y. Bercovitz, A. Rokem, J.S. and Goldberg, I. 1990. “Optimization of L-malic production by *A. flavus* in a stirred fermentor.” *Biotechnology and Bioengineering*. 37 : 1108-1116.
- Blach, P. Bostrom, Z. Lattes, A. and Rico-Lattes, I. 2010. “Recyclable process for sustainable adipic acid production in microemulsions.” *Tetrahedron*. 66(35) : 7124-7128.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Brown, S.H. Bashkirova, L. Berka, R. Chandler, T. Doty, T. McCall, S. Thompson, S. Yaver, D. and Berry, A. 2013. "Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97 : 8903-8912.
- Bulfer, S.L. Scott, E.M. Pillus, L. and Trievel, R.C. 2010. "Structural basis for L-lysine feed-back inhibition of homocitrate synthase." *Journal of Biological Chemistr.* 285 : 10446-10453.
- Cao, W. Chena, X. Luo, J. Yinb, J. Qiaoc, C. and Wana, Y. 2016. "High molecular Weight-poly (l-malic acid) produced by *A. pullulans* with Ca^{2+} added repeated batch culture." *International Journal of Biological Macromolecules*. 85 : 192-199.
- Cavani, F. and Teles, J.H. 2009. "Sustainability in catalytic oxidation: an alternative approach or a structural evolution." *ChemSusChem*. 2 : 508-534.
- Chong, S.K. Mohamad, M.S. Salleh, A.H.M. Choon, Y.W. Chong, C.K. and Deris, S. 2014. "A hybrid of ant colony optimization and minimization of metabolic adjustment to improve the production of succinic acid in *Escherichia coli*." *Computers in Biology and Medicine*. 49 : 74-82.
- Cki, A.V.P. Zelic, B. and Racki, D.V. 2007. "Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells." *Enzyme and Microbial Technology*. 41 : 605-612.
- Das, R.K. and Brar, S.K. 2014. "Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and Insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172 : 2974-2988.
- Denga, Y. Mac, L. and Mao, Y. 2016. "Biological production of adipic acid from renewable substrates: current and future methods." *Biochemical Engineering Journal*. 105 : 16-26.
- Draths, K.M. and Frost, J.W. 1994. "Environmentally compatible synthesis of adipic acid from d-glucose." *Journal of the American Chemical Society*. 116 : 399-400.
- Duuren, J.B.J.H. Wijte, D. Leprince, A. Karge, B. Puchalka, J. Wery, J. Santos, V.A.P.M. Eggink, G. Mars, A.E. 2011 "Generation of a *catR* deficient mutant of *P. putida* KT2440 that produces cis, cis-muconate from benzoate at high rate and yield." *Journal of Biotechnology*. 156 : 163-172.
- Erdocia, X. Prado, R. and Labidi, J. 2014. "Base catalyzed depolymerization of lignin: influence of organosolv lignin nature." *Biomass Bioenergy*. 66 : 379-386.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Frost, K. and Frost, J.W. 1999. "Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: comparative analysis of d-xylose, l-arabinose, and d-glucose carbon sources." *Biotechnology Progress*. 15 : 876-883.
- Fuchs, G. Boll, M. and Heider, J. 2011. "Microbial degradation of aromatic compounds from one strategy to four." *Nature Reviews Microbiology*. 9 : 803-816.
- Göka, A. Gök, M.K. and Lalikoglua, M. 2014. "Equilibrium, kinetics and thermodynamic studies for separation of malic acid on layered double hydroxide (LDH)." *Fluid Phase Equilibria*. 372 : 15-20.
- Harrod, C.J. Rodriguez, S.B. and Thornton, R.J. 1997. "Derepressed utilization of L-malic acid and succinic acid by mutants of *Pachysolen tannophilus*" *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 18 : 379-383.
- Harwood, C.S. and Parales, R.E. 1996. "The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity." *Annual Review of Microbiology*. 50 :553-590.
- Hronská, H. Tokošová, S. Pilníková, A. Křištofiková, L. and Rosenberg, M. 2015. "Bioconversion of fumaric acid to L-malic acid by the bacteria of the genus *Nocardia*." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175 : 266-273.
- Hwang, K.C. and Sagadevan, A. 2014. "One-pot room-temperature conversion of cyclohexane to adipic acid by ozone and UV light." *Science*. 346 : 1495-1498.
- Jeffrey, W.H. Cuskey, S.M. Chapman, P.J. Resnick, S. Olsen, R.H. 1992. "Characterization of *Pseudomonas putida* mutants unable to catabolize benzoate-cloning and characterization of *Pseudomonas* genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal dna fragment able to substitute for *xylS* in activation of the TOL lower-pathway promoter." *Journal of Bacteriology*. 174 : 4986-4996.
- Jimenez, J.I. Minambres, B. Garcia, J.L. and Diaz, E. 2002. "Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440." *Environmental Microbiology*. 4 : 824-841.
- Kai, Y. Hua, Y. Caoa, Z. Liua, X. Liua, Y. and Yang, W. 2013. "Measurement and correlation solubility and mixing properties of L-malic acid in pure and mixed organic solvents." *Fluid Phase Equilibria*. 360 : 466-471.
- Kosuge, T. and Hoshino, T. 1999. "The alpha-amino adipate pathway for lysine biosynthesis is widely distributed among *Thermus* strains." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88 : 672-675.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984(a). "Bergey's manual of systematic bacteriology volume 1." *Williams & Wilkins*. 2 : 267-275.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984(b). "Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2." *Williams & Wilkins*. 2 : 1013-1035.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984(c). "Bergey's manual of systematic bacteriology volume 3." *Williams & Wilkins*. 2 : 661-662.
- Luedeke, V McKetta, J. and Cunningham, W. 1977. **Encyclopedia of Chemical Processing and Design**. 2nd ed. New York : Marcel Dekker Inc.
- Ma, L. Mao, Y. Deng, Y. 2016. "Biological production of adipic acid from renewable substrates: current and future methods." *Biochemical Engineering Journal*. 105 : 16-26
- Matsuhisa, A. Suzuki, N. Noda, T. and Shiba, K. 1995. "Inositol monophosphatase activity from the *Escherichia coli* *suhB* gene product." *Journal of Bacteriology*. 177(1) : 200-205.
- Moon, T. S. Dueber, J. E. Shiue, E. and Prather, K. L. J. 2010. "Use of modular, synthetic scaffolds for Improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*." *Metabolic Engineering*. 12(3) : 298-305.
- Moon, T.S. Yoon, S.H. Roy-Mayhew, J.D. and Prather, K.L. 2009. "Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *E. coli*." *Applied and Environmental Microbiology*. 75 : 589-595.
- Nakayama, S. Tabata, K. Oba, T. Kusumoto, K. Mitsuiki, S. Kadokura, T. and Nakazato A. 2012. "Characteristics of the high malic acid production mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain No. 28." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114(3) : 281-285.
- Niu, W. Draths, K.M. and Frost, J.W. 2002. "Benzene-free synthesis of adipic acid." *Biotechnology Progress*. 18 : 201-211.
- Okada, T. Wulandari, A.P. Kuzuyama, T. and Nishiyama, M. 2009. "Mechanism of substrate recognition and insight into feedback inhibition of homocitrate synthase from *Thermus thermophilus*." *Journal of Biological Chemistry*. 285 : 4195-4205.
- Picataggio, S. and Beardslee, T. 2012. "Biological methods for preparing adipic acid." *United States Patent and Trademark Office*. 12 : 7-37.
- Pines, O. Shemesh, S. Battat, E. and Goldberg, I. 1997. "Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48 : 248-255.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Polen, T. Spelberg, M. and Bott, M. 2013. "Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables." *Journal of Biotechnology*. 167 : 75–84.
- Sato, K. Aoki, M. and Noyori, R. 1998. "A green route to adipic acid: direct oxidation of cyclohexenes with 30 percent hydrogen peroxide." *Science*. 281(5383) : 1646-1647.
- Schmidt, H. Bode, R. Birnbaum, D. 1989. "Regulation of the lysine biosynthesis in *Pichia guilliermondii*." *Antonie Van Leeuwenhoek*. 56 : 337-347.
- Shiue, E. Prather, K.L. 2014. "Improving d-glucaric acid production from myo-inositol in *E. coli* by increasing MIOX stability and myo-inositol transport." *Metabolic Engineering*. 22 : 22-31.
- Skoog, A. Douglas, H. James, F. and Crouch, R. 2007. **Principles of instrumental analysis**. Belmont : Thomson Higher Education.
- Skoog, D. 1986. **Principle of instrumental analysis**. USA : Library of Congress Cataloging in Publication Data.
- Su, J. Wang, T. Wang, Y. Li, Y.Y. and Li, H. 2014. "The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 : 2395-2413.
- Suren, S. Sunsandee, N. Stolcova, M. Hronec, M. Leepipatpiboonc, N. Pancharoen, U. and Kheawhom, S. 2013. "Measurement on the solubility of adipic acid in various solvents at high temperature and its thermodynamics parameters." *Fluid Phase Equilibria*. 360 : 332-337.
- Taing, O. and Taing, K. 2007. "Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*." *European Food Research and Technology*. 224 : 343-347.
- Tang, W. Zhang, S. and Zhao, Z.K. 2010. "Molecular cloning and characterization of a malic enzyme gene from the oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*." *Molecular Biotechnology*. 45 : 121-128.
- Vardon, D.R. Franden, M.A. Johnson, C.W. Karp, E.M. Guarnieri, M.T. Linger, J.G. Salm, M.J. Strathmann, T.J. and Beckham, G.T. 2015. "Adipic acid production from lignin." *Energy and Environmental Science*. 8 : 617-628.
- Wang, X. Gong, C. S. and Tsao, G.T. 1998. "Production of L-malic acid via biocatalysis employing wild-type and respiratory-deficient yeasts." *Humana Press*. 70 : 845-848.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Werpy, T. and Petersen, G. 2004. *Top Value Added Chemicals from Biomass*. Washington DC : US Department of Energy.
- West, T. P. 2011. "Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species." *Biotechnology Letters*. 33 : 2463-2467.
- Xu, H. Andi, B. Qian, J. West, A.H. and Cook, P.F. 2006. "The alpha-aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi." *Cell Biochemistry and Biophysics*. 46 : 43-64.
- Yi, J. Draths, K.M. Li, K. and Frost, J.W. 2003. "Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*." *Biotechnology Progress*. 19 : 1450-1459.
- Zambanini, T. Sarikaya, E. Kleinederg, W. Buescher, J.M. Meurer, G. Wierckx, N. and Blank, L.M. 2016. "Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1." *Biotechnology for Biofuels*. 9 : 67-74.
- Zhang, X. Wang, S. Shanmugam, K.T. and Ingram, L.O. 2011. "L-Malate Production by Metabolically Engineered *Escherichia coli*." 77(2) : 427-434.
- Zheng, Y. Chi, Z. Ahring, B.K. and Chen, S. 2012. "Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: ammonia's effect." *Biomass and Bioenergy*. 37 : 114-121

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการคัดแยกจุลินทรีย์

1.1 สูตรอาหารแข็ง Selective medium (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose หรือ Xylose	ร้อยละ 10	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Yeast extract	ร้อยละ 0.5	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
KH ₂ PO ₄	ร้อยละ 0.1	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
MgSO ₄ ·7H ₂ O	ร้อยละ 0.05	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
CaCO ₃	ร้อยละ 1	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Agar	ร้อยละ 2	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

1.2 สูตรอาหารแข็ง Yeast Extract Peptone Dextrose (หนังสือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป, คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา)

Glucose หรือ Xylose	ร้อยละ 2	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Peptone	ร้อยละ 2	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Yeast extract	ร้อยละ 1	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
CaCO ₃	ร้อยละ 1	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Agar	ร้อยละ 1.5	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2. สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อตรวจสอบการผลิตกรด

2.1 สูตรอาหาร Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose หรือ Xylose	ร้อยละ 10	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
NH ₄ Cl	ร้อยละ 0.3	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
KH ₂ PO ₄	ร้อยละ 0.05	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
MgSO ₄ ·7H ₂ O	ร้อยละ 0.05	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Yeast extract	ร้อยละ 0.1	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
CaCO ₃	ร้อยละ 1	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ภาคผนวก ข

การตรวจสอบการผลิตกรดอะดิคหรือกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ

1. การตรวจสอบการผลิตกรดอะดิคหรือกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ

ตารางที่ ข1 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตกรดอะดิคหรือกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ

Isolate	Medium	Condition		Concentration (g/l)		
		Carbon Sources 10% (w/v)	Cultivation Time (day)	Adipic acid	Malic Acid	Succinic acid
MG3	Shaker culture	Glucose	7	7.512	0.751	0.000
	Selective medium	Glucose	7	0.389	0.187	0.000
	YPD	Glucose	7	6.575	0.000	0.000
LG1	Shaker culture	Glucose	7	5.531	0.352	0.444
	Selective medium	Glucose	7	8.359	1.430	1.991
	YPD	Glucose	7	5.298	2.041	0.000
NG6	Shaker culture	Glucose	5	4.213	2.507	0.000
	Selective medium	Glucose	5	2.647	0.228	1.321
	YPD	Glucose	5	3.595	0.103	1.237
BX1	Shaker culture	Xylose	4	0.000	44.370	0.000
	Selective medium	Xylose	4	0.000	0.000	0.000
	YPD	Xylose	4	0.000	0.000	0.000

2. การตรวจสอบปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิก

ตารางที่ ข2 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิค
หรือกรดมาลิก

Isolate	Condition			Concentration (g/l)	
	Carbon Sources (w/v)	Cultivation Time (day)	Final pH		
MG3	Glucose 10%	7	6.15	Adipic acid	0.3440
	Glucose 15%	7	6.09		0.3120
	Glucose 20%	7	6.15		0.4300
	Glucose 25%	7	6.05		0.5340
LG1	Glucose 10%	7	5.93		16.758
	Glucose 15%	7	5.86		12.9340
	Glucose 20%	7	6.10		6.9220
	Glucose 25%	7	5.85		7.8480
NG6	Glucose 10%	7	6.05		2.1270
	Glucose 15%	7	5.95		2.2860
	Glucose 20%	7	5.81		1.1370
	Glucose 25%	7	5.81		1.3680
BX1	Xylose 10%	3	3.57	Malic Acid	33.1040
	Xylose 15%	3	3.60		25.2590
	Xylose 20%	3	3.72		18.1240
	Xylose 25%	3	3.90		12.4610

3. การตรวจสอบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะดีพิค หรือกรดมาลิก

ตารางที่ ข3 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิต กรดอะดีพิค หรือกรดมาลิก

Isolate	Condition				Concentration (g/l)	
	Carbon Sources 100 g/L	CaCO ₃ (g/L)	Cultivation Time (day)	Final pH		
MG3	Glucose	10	7	5.69	Adipic acid	0.245
	Glucose	20	7	5.89		0.012
	Glucose	30	7	5.88		0.440
LG1	Glucose	10	7	5.29		3.425
	Glucose	20	7	5.27		9.768
	Glucose	30	7	5.31		15.695
NG6	Glucose	10	7	6.46		0.048
	Glucose	20	7	7.33		0.047
	Glucose	30	7	7.03		0.049
BX1	Xylose	10	5	7.39	Malic Acid	0.047
	Xylose	20	5	6.74		0.070
	Xylose	30	5	7.46		0.105

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส

1.1 นำน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสไปอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.2 ชั่งน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส 0.1 กรัม ลงบนกระดาษอะลูมิเนียม นำน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่ชั่งได้ ใส่ลงไปในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปละลายน้ำตาลและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสหรือไซโลส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	0

1.4 นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.5 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส

2. การเตรียมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

2.1 ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid ปริมาณ 5 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นละลายสาร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2.2 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 8 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นละลายสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 ค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทีละน้อยลงไปนในสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid คนจนเข้ากันหมด อุณหภูมิที่ได้นั้นใส่ด้วยเครื่อง Hot Plate stirrer

2.4 ค่อยๆเติมโพแทสเซียมทาร์เทรตลงไปทีละน้อยจนครบปริมาณ 150 กรัม วางไว้จน สารละลายเย็นตัว และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มิลลิลิตร

3. การเตรียม Mobile phase สำหรับการวิเคราะห์กรดอะดิพิคหรือกรดมาลิกด้วย เครื่อง

HPLC

3.1 เตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 0.005 โมลาร์

สูตรโมเลกุล	H_2SO_4	
น้ำหนักมวลโมเลกุล (MW)	98.08	กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น (D)	1.84	กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

วิธีการคำนวณ

$$\begin{aligned}
 \text{จากสมการ} \quad C_1 V_1 &= C_2 V_2 & (1) \\
 C_1 &= \frac{10 (D \times \%)}{MW} \\
 &= \frac{10 (1.84 \times 95)}{98.08} \\
 \text{ดังนั้น} \quad C_1 &= 17.82 \quad \text{โมลาร์} \\
 \text{นำ } C_1 \text{ แทนใน (1) จะได้} \\
 17.82 (V_1) &= 0.005 (1,000) \\
 V_1 &= \frac{0.005(1,000)}{17.82} \\
 \text{ดังนั้น} \quad V_1 &= 0.281 \quad \text{มิลลิลิตร} \\
 &= 281 \quad \text{ไมโครลิตร}
 \end{aligned}$$

3.2 เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 17.82 โมลาร์ ปริมาตร 281 ไมโครลิตร ลง ในน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.3 นำสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ได้ไปกรองด้วยแผ่นกรอง Polypropylene (PP) membrane ขนาด 0.45 ไมครอน

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท MG3

Database : 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)

Optimize for : Highly similar sequences (megablast)

Query Length : 1010

```

ID   EMBOSS_001; SV 1; linear; unassigned DNA; STD; UNC; 1010 BP.
XX
XX
SQ   Sequence 1010 BP; 266 A; 226 C; 293 G; 225 T; 0 other;
GAGCTTGCTC CTTTGAGATT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CGTCTGGATA ACCGACCTAT      60
GGACTGGGAT AACTTCGGGA AACC GGACCT AATACCGGAT AACATATTGA ACCG CAGGGT      120
TCGATATTGA AAGGCGGCGT TGCTGTCAC TATCGATGGA TCCTCGCCGT AATATCTAGT      180
TGGTAATGTA ACGGCTTACC ATGGCAACCA TGCCTAACCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC      240
ACGCTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AACAAATAGG AATCTTCCGC      300
AATGGGCGAA AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGACTGAT GAAGGTCTTC GGATCGTAAA      360
ACTCTGTTAT CAGGGAAGAA CAAATGTGTA ATTA ACTGTG CACATCTTGA CGGTACCTGA      420
TCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTACGT GGCAAGCGTT      480
ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCGT ATGCGGTTTT TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC      540
CACGGCTCAA CCGTGGAGGG TCATTGGA AAA CTGGAAA ACT TGAGTGCAGA AGAGGAAAGT      600
GGAATTCCAT GTGTAGCGGT GAAATGCGCA GAGATATGGA GGAACACCAG TGGCGAAGGC      660
GACTTTCTGG TCTGTA ACTG ACGCTGATGT GCGAAAGCGT GGGGATCAA CAGGATTAGA      720
TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGA GTGCTAAGTG TTAAGGGGTT TCCGCCCTT      780
ATTGCTGCAG CTAACGCATT AAGCACTCCG CCTGGGGAGT ACGACCGCAT GGTGAAACT      840
CACAGGAATT GACGGGGACC CGCACAAACG GTGGAGCATG TGTTTTAATT CGAAGCAACG      900
CGAATAACCT TACCAAATCT TGACATCCTT TGACCGCTCT AGAGATAGAG TCTTCCCCTT      960
CGGGGGACAA AGTGACAGGT GGCTGCATGG TTGTCGTCAG CTCGTGTCGT      1010

```

//

Staphylococcus warneri SG1 strain SG1 16S ribosomal RNA, complete sequence

Sequence ID: [ref|NR_102490.1](#) Length: 1557 Number of Matches: 1Range 1: 76 to 1085 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1661 bits(899)	0.0	974/1011(96%)	2/1011(0%)	Plus/Plus	
Query	1	GAGCTTGCTCCTTTGAGATTAGCGCGGACGGGTGAGTAACGCTCGGATAACCGACCTAT			60
Sbjct	76	GAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACGCTGGATAACCTACCTAT			135
Query	61	-GGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGACCTAATACCGGATAACATATTGAACCGCAGGG			119
Sbjct	136	AAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATATTGAACCGCATGG			195
Query	120	TTCGAATATTGAAGGCGCGTGTCTGTCACTTATCGATGGATCCTCGCCGTAATACTAG			179
Sbjct	196	TTCAATAGTGAAGGCGCGTGTCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCGTATTAGCTAG			255
Query	180	TTGGTAATGTAAACGGCTTACCATGGCAACCATGCTAACCGACCTGAGAGGGTGAATCGGC			239
Sbjct	256	TTGGTAAGGTAAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAATCGGC			315
Query	240	CACGCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGAGGCAACAATAGGGAATCTCCG			299
Sbjct	316	CACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGAGGCAACASTAGGGAATCTCCG			375
Query	300	CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGACTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA			359
Sbjct	376	CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGACTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA			435
Query	360	AACTCTGTATCAGGGAAGCAAAATGTGTAATTAAGTGTGACATCTTGACGGTACCTG			419
Sbjct	436	AACTCTGTATCAGGGAAGCAAAATGTGTAAGTAACTGTGACATCTTGACGGTACCTG			495
Query	420	ATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTACGTGGCAAGCGT			479
Sbjct	496	ATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGT			555
Query	480	TATCCGGAATTAITGGGCGTAAAGCGCGGTATGCCGTTTTTTTAACTCTGATGTGAAGC			539
Sbjct	556	TATCCGGAATTAITGGGCGTAAAGCGCGGTATGCCGTTTTTTTAACTCTGATGTGAAGC			616
Query	540	CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAITGGAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAGAGGAAAG			599
Sbjct	616	CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAITGGAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAGAGGAAAG			675
Query	600	TGGAATCCATGTGTAGCGGTGAATGCCAGAGATATGGAGAACACCAAGTGGCGAAGG			659
Sbjct	676	TGGAATCCATGTGTAGCGGTGAATGCCAGAGATATGGAGAACACCAAGTGGCGAAGG			735
Query	660	CGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAG			719
Sbjct	736	CGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAG			795
Query	720	ATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAAAGGGTTTTCCGCCCT			779
Sbjct	796	ATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAAAGGGTTTTCCGCCCT			855
Query	780	TATTGCTGCAGCTAAACGATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCATGGTTGAAC			839
Sbjct	856	TATTGCTGCAGCTAAACGATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCATGGTTGAAC			915
Query	840	TCACAGGAATTGACGGGACCCGCAAAACGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAAC			899
Sbjct	916	TCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAAAACGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAAC			975
Query	900	GCGAATAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCT			959
Sbjct	976	GCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCT			1035
Query	960	TCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGCTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG			1010
Sbjct	1036	TCGGGGGACAAAGTGACAGGTGG-IGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG			1085

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท LG1

Database : 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)

Optimize for : Highly similar sequences (megablast)

Query Length : 1340

```

ID  EMBOSS_001; SV 1; linear; unassigned DNA; STD; UNC; 1340 BP.
XX
XX
SQ  Sequence 1340 BP; 333 A; 309 C; 428 G; 268 T; 2 other;
    TTTGACGAGT GGC6GACGGG TGAGTAATGT CTGGGAAACT GCCCGATGGA GGGGGATAAC      60
    TACTGGAAAC GGTAGCTAAT ACCGCATAAC GTCTTCGGAC CAAAGAGGGG GACCTTCGGG      120
    CCTCTTGCCA TCGGATGTGC CCAGATGGGA TTAGCTAGTA GGTGGGGTAA CGGCTCACCT      180
    AGGCGACGAT CCCTAGCTGG TCTGAGAGGA TGACCAGCCA CACTGGAAct GAGACACGGT      240
    CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGCAA GCCTGATGCA      300
    GCCATGCCGC GTGTATGAAG AAGGCCTTCG GTTGTAAAG TACTTTCAGC GGGGAGGAAG      360
    GGAGTGAGGT TAATAATTCA TTCATTGACG TTACCCGCGAG AAGAAGCACC GGCTAACTCC      420
    GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGGAGGGTG CAAGCGTTAA TCGGAATTAC TGGGCGTAAA      480
    GCGCACGCAG GCGGTCTGTC AAGTCGGATG TGAATCCCC GGGCTCAACC TGGGAActGC      540
    ATTCGAAACT GGCAGGCTTG AGTCTCGTAG AGGGGGGTAG AATTCCAGGT GTAGCGGTGA      600
    AATGCGTAGA GATCTGGAGG AATACCGGTG GCGAAGGCGG CCCCTGGAC GAAGACTGAC      660
    GCTCAGGTGC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA CCTGGTAGT CCACGCCGTA      720
    AACGATGTCT ACTTGGGAGG CTGTGCYCTT GARGCGTGGC TTCCGGAGCT AACGCGTTAA      780
    GTAGACCGCC TGGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAACTC AAATGAATTG ACGGGGGCCC      840
    GCACAAGCGG TGGATATGGT GGTTTAATTC GATGCAACGC GAAGAActTT ACCTACTCTT      900
    GACATCCAGA GAACTTAGCA GAGATGCTTT GGTGCCTTCG GGAActCTGA GACAGGTGCT      960
    GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA AGTCCCAGCA CGAGCGCAAC      1020
    CCTTATCCTT TGTTGCCAGC GGTCCGGCCG GGAActCAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC      1080
    TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGAGTAGGG CTACACACGT      1140
    GCTACAATGG CGCATAAAA GAGAAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG      1200
    CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC      1260
    GTGGATCAGA ATGCCACGGT GAATACGTTT CCTGGCCTTG TACACACC6C CCGTCACACC      1320
    ATGGGAGTGG GTTGCAAAAAG
  
```

//

Pluralibacter gergoviae strain JCM1234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [ref|NR_024641.1](#) Length: 1450 Number of Matches: 1

Range 1: 64 to 1400		GenBank	Graphics		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2403 bits(1301)	0.0	1327/1340(99%)	5/1340(0%)	Plus/Plus	
Query	3	TGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTA	62		
Sbjct	64	TGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTA	123		
Query	63	CTGGAACCGTAGCTAATACCGCATAACGCTCTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC	122		
Sbjct	124	CTGGAACCGTAGCTAATACCGCATAACGCTCTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC	183		
Query	123	TCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAAACGGCTCACCTAG	182		
Sbjct	184	TCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAAACGGCTCACCTAG	243		
Query	183	GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCC	242		
Sbjct	244	GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCC	303		
Query	243	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC	302		
Sbjct	304	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC	363		
Query	303	CATGCCCGGTGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAAGG	362		
Sbjct	364	CATGCCCGGTGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAAGG	423		
Query	363	AGTGGGTTAATAAT-TCATTCATGACGTTACCCGCGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG	421		
Sbjct	424	AGTGGGTTAATAAACCCTCANTCATGACGTTACCCGCGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG	483		
Query	422	TGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCRAAGCGTAAATCGGAATACTGGCGTAAAG	481		
Sbjct	484	TGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCRAAGCGTAAATCGGAATACTGGCGTAAAG	543		
Query	482	CGCAGCAGCCCGGCTCTGTCAGTGGGATGGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCA	541		
Sbjct	544	CGCAGCAGCCCGGCTCTGTCAGTGGGATGGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCA	603		
Query	542	TTCGAAACTGGCAGGCTTGGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAA	601		
Sbjct	604	TTCGAAACTGGCAGGCTTGGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAA	663		
Query	602	ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGGCGGCCCTTGGACGAAAGACTGACG	661		
Sbjct	664	ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGGCGGCCCTTGGACGAAAGACTGACG	723		
Query	662	CTCAGGTGCGAAACGCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAA	721		
Sbjct	724	CTCAGGTGCGAAACGCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAA	783		
Query	722	ACGATGCTACTTGGGAGGCTGTGCYCTTGARGCGTGGCTCCGGAGCTAAGCGGTAAAG	781		
Sbjct	784	ACGATGCTACTTGGGAGGCTGTGCYCTTGARGCGTGGCTCCGGAGCTAAGCGGTAAAG	842		
Query	782	TAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGCCCG	841		
Sbjct	843	TAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGCCCG	901		
Query	842	CACAAGCGGTGGAT-ATGGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT	900		
Sbjct	902	CACAAGCGGTGGAT-ATGGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT	960		
Query	901	GACATCCAGAGAAGTACGAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAAGCTGAGACGGGTGCT	960		
Sbjct	961	GACATCCAGAGAAGTACGAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAAGCTGAGACGGGTGCT	1020		
Query	961	GCATGGCTGCTCAGCTCAGCTGCTGTTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1020		
Sbjct	1021	GCATGGCTGCTCAGCTCAGCTGCTGTTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1080		
Query	1021	CCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAC	1080		
Sbjct	1081	CCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAC	1140		
Query	1081	TGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT	1140		
Sbjct	1141	TGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT	1200		
Query	1141	GCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTG	1200		
Sbjct	1201	GCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTG	1260		
Query	1201	CGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTGGGAATCGCTAGTAATC	1260		
Sbjct	1261	CGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTGGGAATCGCTAGTAATC	1320		
Query	1261	GTGGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCCTGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCC	1320		
Sbjct	1321	GTGGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCCTGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCC	1380		
Query	1321	ATGGGAGTGGGTTGCAAAAAG 1340			
Sbjct	1381	ATGGGAGTGGGTTGCAAAAAG 1400			

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท NG6

Database : 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)

Optimize for : Highly similar sequences (megablast)

Query Length : 1028

```

ID  EMBOSS_001; SV 1; linear; unassigned DNA; STD; UNC; 1028 BP.
XX
XX
SQ  Sequence 1028 BP; 292 A; 252 C; 237 G; 247 T; 0 other;
GGCATGCATG GGTCTACACT GCAGTCTCAC TGTATGTGAT CAGGAACTTG GTCCTTTTGG      60
GTCTTTGGAG AAAGATGAGT CCATGTGGGT AACCAACCTC TAGGAATGGG ATAACTTCAG      120
GAAACCGGAC CTTATACCCG AAAACATATT TCACCCAGG  GATGAGCCAG CGTAAGGCCT      180
CTTTGCTGGC GCTGTTACGT GGTTCACGG  CGTAGTACGT AGGTTGGACG GTCACGACGT      240
ACAACAGCAC TGATACGTAG ACGACGACCA AAGTCCATCG GGAAGCCTGG ACCTGAAACA      300
CAGTCCAAAG GCCGACAGCA GGATCCAATA TTGCATCTTG CGCGAAGAAC GAATGCCTAA      360
CGGACCAGCG TCTCGAGAGT GACGAAGGTC TTCGGATCCT AAAACTATGT TATGAAGGAA      420
GACATGATAT GTACCTCACT GTGCACATCT TGACGGTACC TGATCAGAAAT GCCACGGCTA      480
ACTACGTGCC AACATCCTCT GTAATACGTA AGTGGCAATC GTTATCCTTA ATTATTGAGC      540
GTAAATCGCT CGTAGGCGAC TTTATAGGTC TAATGTGAAA GCTCACTCCT CAACCTTAGA      600
TGGACATTGG AAACCTTTGAA ACTTGCATGC AGAAGAAGAA ATTGAAATTC CATGTGTAAC      660
TGTGAAATGC TCAGAAATAT GGAGGAACGC CAATGGATAA AGCTACTTTC TGGTCTACCT      720
TGACCCCTAT GTGCTAAATC GTGGGGATCA TACAAGATTA TATACCCTGG CTAATCCACA      780
CCATCAAACC ATCAGAGCTA GTAGTTATGC AGGTTCCACC CCTTAGTGAA TTCAGCTAAC      840
GCCTTCACCA CTCCTCCAGC GTGAGTACTA CCTTCAAGGT TGACACTCAG ACGCTTTCAC      900
GGGCACCCGC GGAAACGCTG GATCCAGAGA TGTACATCGC AGCAACGCGA ACTACCTTAC      960
CAGATCTTGA CATCTGTTGA CAGCTCTAGA GATAAAATCT TCCCCTTCGG TGGCACAAACG     1020
TGACAGGT                                     1028

```

//

Staphylococcus pasteurii 16S ribosomal RNA, complete sequence

Sequence ID: [ref|NR_121749.1](#) Length: 1541 Number of Matches: 1Range 1: 105 to 1052 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
569 bits(308)	7e-162	747/961(78%)	21/961(2%)	Plus/Plus
Query 76	134	TGAGT-CCATGTGGGTAACCCACCTCTAGGAATGGGATRACTTCAGGAACCGGACCTTA		
Sbjct 105	164	TGAGTAACACCGTGGATACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAACCGGAGCTAA		
Query 135	194	TACCGAAACATATTTACCCAGGGATGAGCCAGCGTAAGGCCTCTTTGCTGGCGCTG		
Sbjct 165	223	TACCGGATAACATATTGAACCGCATGGTTCA-ATAGTGAAAGGCGGCTTTGCTGTCACTT		
Query 195	253	TTACGTGGTCCACGGCGTAGTACGTAGGTTGG-ACGGTCACGACGTACAAACAGCACTGA		
Sbjct 224	282	ATAGATGGATCCGCGCGTATTAGCTA-GTTGGTAAGGTGACGGCTTACCAAGGCAACGA		
Query 254	311	TACGTAGACGAC--GACCAAAGTCCATCGGGAAGCCTGGACCTGAAACACAGTCCAAAGG		
Sbjct 283	340	TACGTAGCCGACCTGA-GAGGGT-GATCGGCCACACTGGAAGTGAACACAGTCCAGACT		
Query 312	371	CCGACAGCAGGATCCAAATATTCATCTTCCGCGAAGAACCAATGCCIAACGGACCAGCGT		
Sbjct 341	400	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGGAGCAACGC		
Query 372	430	CTCAGAGTGCAGGAGTCTTCGGATCCTAAACTATGTTATGAAGGAAGA-CAIGATAT		
Sbjct 401	459	CGCGTGAAGTGAAGGCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACA-AATGT		
Query 431	490	GTACCTCACGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAATGCCACGGCTAAGTACGTGCC		
Sbjct 460	519	GTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAAGCCACGGCTAAGTACGTGCC		
Query 491	550	AACATCCTCTGTAATACGTAAGTGGCAATCGTATCCTTAATATTGAGCGTAAATCGCT		
Sbjct 520	579	AGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGRAATTATTGGGCGTAAAGCGCG		
Query 551	610	CGTAGGCGACTTTATAGGCTAATGTGAAAGCTCACTCCTCAACCTTAGATGGACATTGG		
Sbjct 580	639	CGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACCGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGG		
Query 611	670	AAACTTGAACACTGATGCAGAGAAGAAATGAAATCCATGTGTAAGTGTGAAATGC		
Sbjct 640	699	AAACTGGAACACTGAGTGCAGAGAAGAAATGAAATCCATGTGTAAGTGTGAAATGC		
Query 671	728	TCAGAAATATGGAGGAACGCCAATGGATAAAGCTACTTTCTGGTCT--ACCTTACCCCTT		
Sbjct 700	758	GCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAC-TGACGCTG		
Query 729	788	ATGTGCTAATCGTGGGATCATACAGATTATATACCCTGGCTAATCCACACCATCAA		
Sbjct 759	816	ATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGG-TAGTCCACGCGCT-AAA		
Query 789	847	CCATCAGAGCTA-GTAGTTATGCAAGTTCCACCCCTTAGTGAAATCAGCTAACGCGCTTCA		
Sbjct 817	874	CGATGAGTGTAAAT-GTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGC-TGCAGCTAACGCAATTA		
Query 848	907	CCACTCCTCCAGCGTGAAGTACTACCTTCAAGGTTGACACTCAGACGCTTTCACGGGCACC		
Sbjct 875	932	GCACTCCGCTGGG-GAGTACGACCG-CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC		
Query 908	967	CGCGAAACGCTGSAATCCAGAGATGTACATCGCAGCAACGCGAAGTACCTTACAGATCT		
Sbjct 933	992	CGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGTACCTTACCAATCT		
Query 968	1027	TGACATCTGTTGACAGCTCTAGAGATAAAAICTTCCCTTCGGTGGCACAACGTGACAGG		
Sbjct 993	1051	TGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCTTCGGGGG-ACAAAGTGACAGG		
Query 1028		T 1028		
Sbjct 1052		T 1052		

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท BX1

Database : 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)

Optimize for : Highly similar sequences (megablast)

Query Length : 1188

```

ID  EMBOSS_001; SV 1; linear; unassigned DNA; STD; UNC; 1198 BP.
XX
XX
SQ  Sequence 1198 BP; 290 A; 264 C; 391 G; 253 T; 0 other;
    TCCGGGAAAC TGGAGCTAAT ACCGCATGAT ACCTGAGGGT CAAAGGCGCA AGTCGCCTGT      60
    GGAGGAGCCT GCGTTTGATT AGCTTGTGGG TGGGGTAATG GCCTACCAAG GCGATGATCA      120
    ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC      180
    GGGAGGCAGC AGTGGGGAAAT ATTGGACAAT GGGGGCAACC CTGATCCAGC AATGCCGCGT      240
    GTGTGAAGAA GGTTCGGA TTGTAAGCA CTTTCGGCGG GGACGATGAT GACGGTACCC      300
    GCAGAAGAAG CCCCAGCTAA CTTCTGCGCA GCAGCCGCGG TAATACGAAG GGGGCTAGCG      360
    TTGCTCGGAA TGACTGGGCG TAAAGGGCGT GTAGGCGGTT TGCACAGTTA GATGTGAAAT      420
    CCCCAGGCTT AACCTGGGAG CTGCATTTAA TACGTGCAGA CTAGAGTGTG AGAGAGGGTT      480
    GTGGAATTCC CAGTGTAGAG GTGAAATTCG TAGATATTGG GAAGAACACC GGTGGCGAAG      540
    GCGGCAACCT GGCTCATGAC TGACGCTGAG GCGCGAAAAG GTGGGGAGCA AACAGGATTA      600
    GATACCCTGG TAGTCCACGC TGTAACGAT GTGTGCTGGA TGTGGGTAA CTTAGTACT      660
    CAGTGTGCGT GCTAACGCGA TAAGCACACC GCCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGTTGAAAC      720
    TCAAAGGAAT TGACGGGGG CCGCACAGC GGTGGAGCAT GTGTTTAAAT TCGAAGCAAC      780
    GCGCAGAACC TTACCAGGGC TTGTATGGGT AGGCTGTATC CAGAGATGGA TATTTCCCGC      840
    AAGGGACCTA CCGCACAGGT GCTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG      900
    GTTAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCCTAT CTTTAGTTGC CAGCATGTTT GGGTGGGCAC      960
    TCTAGAGAGA CTGCCGGTGA CAAGCCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG     1020
    CCCTTATGTC CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGCGATG ACAATGGGAA GCTAGATGGC     1080
    GACATCATGC TGATCTCAA AAGTCGTCTC AGTTCGGATT GCACTCTGCA ACTCGAGTGC     1140
    ATGAAGGTGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGG     1188
  
```

//

Acetobacter persici strain T-120 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [refl|NR_113547.1](#) Length: 1412 Number of Matches: 1Range 1: 107 to 1294 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2178 bits(1179)	0.0	1185/1188(99%)	0/1188(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ACTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGGCGAAGTCGCCT				60
Sbjct 107	ACTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGGCGAAGTCGCCT				166
Query 61	GTGGAGGAGCCTGCGTTTGTATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGAT				120
Sbjct 167	GTGGAGGAGCCTGCGTTTGTATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGAT				226
Query 121	CAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT				180
Sbjct 227	CAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT				286
Query 181	ACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGC				240
Sbjct 287	ACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGC				346
Query 241	GTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACATTCGGCGGGGACGATGATGACGGTAC				300
Sbjct 347	GTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACATTCGGCGGGGACGATGATGACGGTAC				406
Query 301	CCGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAG				360
Sbjct 407	CCGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAG				466
Query 361	CGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGCACAGTTAGATGTGAA				420
Sbjct 467	CGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGCACAGTTAGATGTGAA				526
Query 421	ATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTAATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGG				480
Sbjct 527	ATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTAATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGG				586
Query 481	TTGTGGAATTCACAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCACCGGTGGCGA				540
Sbjct 587	TTGTGGAATTCACAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCACCGGTGGCGA				646
Query 541	AGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT				600
Sbjct 647	AGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT				706
Query 601	TAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTAGTTA				660
Sbjct 707	TAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTAGTTA				766
Query 661	CTCAGTGTCTAGCTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAA				720
Sbjct 767	CTCAGTGTCTAGCTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAA				826
Query 721	ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCA				780
Sbjct 827	ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCA				886
Query 781	ACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGGGTAGGCTGTATCCAGAGATGGATATTTCCC				840
Sbjct 887	ACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGGGTAGGCTGTATCCAGAGATGGATATTTCCC				946
Query 841	GCAAGGACCTACCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTG				900
Sbjct 947	GCAAGGACCTACCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTG				1006
Query 901	GGTTAAGTCCCACACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTGGGTGGGCA				960
Sbjct 1007	GGTTAAGTCCCACACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTGGGTGGGCA				1066
Query 961	CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAGTCCCTCATG				1020
Sbjct 1067	CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAGTCCCTCATG				1126
Query 1021	GCCCTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGATGACAAATGGGAAGCTAGATGG				1080
Sbjct 1127	GCCCTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGATGACAAATGGGAAGCTAGATGG				1186
Query 1081	CGACATCATGCTGATCTCAAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTG				1140
Sbjct 1187	CGACATCATGCTGATCTCAAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTG				1246
Query 1141	CATGAAGTGGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCAAGCCCGGTGAA			1188	
Sbjct 1247	CATGAAGTGGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAA			1294	