



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกและจำแนกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการผลิต

กรด 3-hydroxypropionic acid จากดิน

Selection and identification of microorganism with high potential to
produce 3-hydroxypropionic acid from soil

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกและจำแนกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการผลิต

กรด 3-hydroxypropionic acid จากดิน

Selection and identification of microorganism with high potential to
produce 3-hydroxypropionic acid from soil

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดเลือกและจำแนกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการผลิตกรด 3-hydroxypropionic acid จากดิน

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการ นางสาวสมพิศ สอนโยธา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากตัวอย่างดินและน้ำเสียทั้งหมด 198 ตัวอย่าง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้จำนวน 28 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศและมีการเขย่าพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้อย่างน้อย 2.8 กรัมต่อลิตร 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Y26 และ Y33 ซึ่งไอโซเลท Y26 คัดแยกได้จากน้ำเสียบริเวณร้านบะหมี่ ซอยเก๊ก 1 ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุด 3.4 ± 0.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศไม่พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้อย่างน้อย 2.8 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงได้คัดเลือกไอโซเลท Y26 ไปทำการศึกษาต่อไป เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย 16S rRNA พบว่าไอโซเลท Y26 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 99 และสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุดในช่วง stationary phase และใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ทั้งที่เจริญในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้ 4.5 ± 0.7 และ 7.9 ± 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : กลีเซอรอล ไอโซเลท Y26 3-hydroxypropionic acid *Klebsiella pneumoniae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Selection and identification of microorganism with high potential to produce 3-hydroxypropionic acid from soil

Researcher: Dr.Somphit SORNYOTHA

Faculty: Science

Department: Biology

ABSTRAC

In this study, the microorganisms with high potential to produce 3-hydroxypropionic acid were isolated from various soil and waste water sources. Twenty-eight and three isolates derived from 198 samples could be produced 3-hydroxypropionic acid when cultivated in medium containing glycerol as the sole carbon source under aerobic and anaerobic conditions, respectively. Among them, only 2 isolates from aerobic and shaking cultivation, designated Y26 and Y33 could be produced the 3-hydroxypropionic acid with higher concentration than 2.8 g/L. The highest product concentrations at 3.4 ± 0.4 g/L was obtained from the isolate Y26 which isolated from the waste water in noodle shop at soi Gage 1. However, all of the 3 isolates obtained from anaerobic cultivation could not be produced the 3-hydroxypropionic acid at concentration higher than 2.8 g/L. Therefore, only the isolate Y26 was selected for further study. The study found that, the isolate Y26 was showed similarity to *Klebsiella pneumoniae* (sequence identity, 99%) by the 16S rRNA gene analysis system. The highest product concentration was obtained from the isolate Y26 which produced the 3-hydroxypropionic acid at 4.5 ± 0.7 และ 7.9 ± 1.0 g/L when cultivated in medium containing glycerol 80 g/L and the stationary time at static and shaking conditions, respectively.

Keywords : Glycerol, The isolate Y26, 3-Hydroxypropionic acid, *Klebsiella pneumoniae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

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

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณเงินรายได้สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 คุณสมบัติและความสำคัญของ 3-hydroxypropionic acid	4
2.1.1 คุณสมบัติของ 3-hydroxypropionic acid	4
2.1.2 ความสำคัญของ 3-hydroxypropionic acid	5
2.2 กระบวนการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธีทางเคมี	7
2.2.1 กระบวนการออกซิเดชัน 1,3-propanediol ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม	7
2.2.2 กระบวนการออกซิเดชัน 3-hydroxypropionaldehyde ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม	8
2.2.3 กระบวนการไฮเดรชัน acrylic acid โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	8
2.3 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธีทางชีวภาพ	9
2.3.1 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส	10
2.3.2 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล	14
2.3.2.1 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-dependent pathway	17
2.3.2.2 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-independent pathway	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.3 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยการย่อยสลาย acrylic acid และ uracil	20
2.3.4 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate	21
2.4 ความเป็นพิษของ 3-hydroxypropionic acid	22
2.5 การนำ 3-hydroxypropionic acid ไปประยุกต์ใช้งาน	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
3.1 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง	26
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	27
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	29
3.3.1 อาหารสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ	29
3.3.1.1 อาหารเหลวสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ (M9 broth)	29
3.3.1.2 อาหารแข็งสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ (M9 agar)	29
3.3.2 อาหารสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ	29
3.3.2.1 MRS broth	29
3.3.2.2 MRS agar	30
3.4 แหล่งเก็บตัวอย่าง	30
3.5 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและผลิตกรดได้	30
3.6 การตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	31
3.7 การวิเคราะห์ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC	31
3.8 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	31
3.9 การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	32
3.10 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	33
4.1 แหล่งตัวอย่างที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์	33
4.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด	34
4.3 การตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	38
4.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานทั่วไปของไอโซเลท Y26	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลท Y26	43
4.6 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิต 3-hydroxypropionic acid ของ <i>Klebsiella pneumonia</i> Y26	45
4.7 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	49
5.1 สรุปผลการวิจัย	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	51
6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก. หลักฐานเอกสารอ้างอิงสำหรับรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด	59
ภาคผนวก ข. สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย	62
ประวัตินักวิจัย	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารอนุพันธ์ของ 3-hydroxypropionic acid	6
2.2 แสดงผลผลิต ATP และความเป็นไปได้ของการเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานเทอร์โมไดนามิกของการใช้กลูโคสในการสร้าง 3-hydroxypropionic acid	10
2.3 แสดงคุณสมบัติของกลีเซอรอล	16
4.1 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ	35
4.2 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ	36
4.3 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ	39
4.4 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ	40
4.5 แสดงปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	42
4.6 แสดงปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร) โดย <i>Klebsiella pneumonia</i> Y26 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของกลีเซอรอลแตกต่างกัน	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxypropionic acid	5
2.2 สารอนุพันธ์ที่ผลิตโดยใช้ 3-hydroxypropionic acid เป็นสารตั้งต้น	6
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxypropionic acid และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ	7
2.4 กระบวนการออกซิเดชัน 1, 3-propanediol ที่มีแพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต 3-hydroxypropionic acid	8
2.5 กระบวนการออกซิเดชันของ 3-hydroxypropionaldehyde ที่มีแพลเลเดียม หรือแพลทตินัมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต 3-hydroxypropionic acid	8
2.6 กระบวนการไฮเดรชัน acrylic acid โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	9
2.7 วิธีเมตาบอลิซึมในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส	11
2.8 แสดง Metabolic pathways ในกระบวนการเมตาบอลิซึมกลีเซอรอล ผ่าน 2 pathway ได้แก่ CoA-dependent pathway และ CoA-independent pathway	17
2.9 แสดงการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธี CoA-independent pathway	20
2.10 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยอาศัยกระบวนการย่อยสลาย uracil	20
2.11 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธี autotrophic ผ่านวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate	22
2.12 สารตั้งต้นทางเคมีและทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid และผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก 3-hydroxypropionic acid	25
4.1 ตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์	33
4.2 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีและการเกิดโซนไฮของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ	34
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลท Y26 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	43
4.4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene ของไอโซเลท Y26	44
4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตและปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรด 3-HP) ของ <i>Klebsiella pneumoniae</i> Y26 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth ที่เติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	45
4.6 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionic acid	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัญหาการกำลังหมดไปของ fossil resources ส่งผลต่อปริมาณที่ลดลงของสาร petrochemical และกระทบต่อสิ่งต่าง ๆ ที่ใช้สาร petrochemical เป็นสารตั้งต้นในการผลิตด้วย ดังนั้น US Department of Energy (DOE) จึงได้เล็งหาสาร bio-based platform chemicals ขึ้นมาเพื่อทดแทนสาร petrochemistry-based platform chemicals และหนึ่งในจำนวนสารเหล่านั้นได้แก่ 3-hydroxypropionic acid หรือ 3-hydroxypropanoate (3-HP) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญและกำลังได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจาก 3-hydroxypropionic acid ถูกจัดอยู่สามอันดับแรกของ bio-based platform chemicals จากทั้งหมด 12 สารเคมี ซึ่งคัดเลือกโดย US Department of Energy (DOE) (Werpy and Petersen, 2004) โดย 3-hydroxypropionic acid สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น acrylic acid, 1,3-propanediol, methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-HP, malonic acid, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น นอกจากนี้ 3-hydroxypropionic acid ยังสามารถใช้เป็น cross-linking agent สำหรับ polymer coating หรือใช้เป็น antistatic agent สำหรับอุตสาหกรรมสิ่งทอ หรือแม้กระทั่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต biodegradable polymer ซึ่งใช้ทดแทน petrochemistry-based polymer ได้อีกเช่นกัน (Zhu และคณะ, 2004) ซึ่งเห็นได้ว่า 3-hydroxypropionic acid มีประโยชน์มากมายเป็นอย่างยิ่งสามารถใช้เป็น building block ในการผลิตสารต่าง ๆ ทดแทนการใช้ petrochemistry-based platform chemical ได้เป็นอย่างดี และในปัจจุบันมีกระบวนการผลิต 3-hydroxypropionic acid ทั้งวิธีการทางเคมีและวิธีการทางชีวภาพ แต่วิธีการทางเคมีนั้นใช้สารตั้งต้นที่มีราคาสูง อีกทั้งปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ได้ก็ยังไม่มากพอรวมทั้งบางกระบวนการมีสารพิษ (โซเดียมไฮไดรด์) ร่วมด้วย (Pina และคณะ, 2011) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ดังนั้นวิธีการผลิตทางชีวภาพโดยอาศัยจุลินทรีย์นั้นจึงได้รับความสนใจและกำลังได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และจากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการพัฒนาและตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยเหตุนี้ย่อมเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ในประเทศไทย เพราะต้องลงทุนสูงเพื่อซื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มาผลิต 3-hydroxypropionic acid และการซื้อเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขายก็มีได้เป็นไปอย่างขายขาด ดังนั้นเพื่อความมั่นคงและยั่งยืนทางเศรษฐกิจประกอบกับอาศัยความได้เปรียบทางความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ซึ่งถ้าเราได้เป็นเจ้าของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงแล้วนั้นโอกาสที่จะพัฒนาและต่อยอดเพื่อผลิต 3-hydroxypropionic acid ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศย่อมมีความเป็นไปได้สูงขึ้นด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้อย่างน้อย

2.8 กรัมต่อลิตร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ทั้งที่เจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนจากแหล่งดินหรือแหล่งน้ำเสียต่าง ๆ

1.3.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 คัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำเสียต่าง ๆ

1.4.2 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวเพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณของกรดที่ผลิตได้

1.4.3 ศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1.4.4 การศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.5 ตรวจสอบปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โครงการวิจัยนี้เน้นการทำวิจัยพื้นฐานเชิงประยุกต์ที่ทำให้ได้ผลงานวิจัยเชิงองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำไปต่อยอดได้ อีกทั้งสามารถเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง โดยผลงานที่ได้ยังสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการเรียนการสอนของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสามารถผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาได้อย่างน้อย 2 คน นอกจากนี้ภายหลังจากโครงการวิจัยสิ้นสุดลงคาดว่าจะมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับรองรับการเติบโตของอุตสาหกรรมไบโอดีเซลภายในประเทศซึ่งอาจก่อให้เกิดของเสีย ได้แก่ กลิเซอรอลเป็นปริมาณมากต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

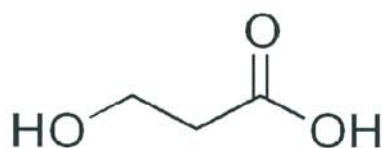
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติและความสำคัญของ 3-hydroxypropionic acid

2.1.1 คุณสมบัติของ 3-hydroxypropionic acid

3-hydroxypropionic acid (3-HP) สูตรเคมีคือ $C_3H_6O_3$ (MW 90.08; CAS Registry Number 503-66-2; pKa 4.51; density 1.08) (ภาพที่ 2.1) จัดเป็น carboxylic acid ที่มี β -hydroxyl group ที่เฉพาะ มีโครงสร้างที่เป็นไอโซเมอร์ของ lactic acid (2-hydroxypropanoic acid) ลักษณะเป็นของเหลว สามารถละลายได้ในน้ำ เมทานอล และอีเทอร์ มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส และไม่มีกลุ่มเมทิลเป็นองค์ประกอบ (Jiang และคณะ, 2009) ซึ่งกลุ่มเมทิลนี้จะส่งผลให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนน้อยลง นอกจากนี้โครงสร้างของสารยังประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบตา ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้ 3-hydroxypropionic acid จึงมีความแข็งแรงทนทานและเป็นสารตัวแทนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอื่น ๆ ได้อย่างหลากหลาย ในอุตสาหกรรมเคมีมีการใช้งานที่หลากหลาย อาทิเช่น ใช้เป็นสารเชื่อมขวาง (crosslinking agent) สำหรับเคลือบพอลิเมอร์ สารหล่อลื่นโลหะ และสารต้านไฟฟ้าสถิต (antistatic agent) สำหรับสิ่งทอ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ที่มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์จำนวนมาก อาทิเช่น 1,3-propanediol (1,3-PDO: $C_3H_8O_2$ -MW 76.09), malonic acid ($C_3H_4O_4$ -MW 104.06), acrylic acid ($C_3H_4O_2$ -MW 72.06), acrylonitrile (C_3H_3N -MW 53.06), methyl acrylate ($C_4H_6O_2$ -MW 86.09), ethyl 3-HP ($C_5H_{10}O_3$ -MW 118.13) และ acrylamide (C_3H_5NO -MW 71.08) (Raj และคณะ, 2008) ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในปริมาณมากสำหรับการผลิตสารยึดติด บรรจุภัณฑ์พลาสติก พอลิเมอร์เครื่องสำอางค์ น้ำยาทำความสะอาด และเรซิน ด้วยเหตุนี้ 3-HP จึงถูกเลือกให้เป็นสารเคมีมูลค่าเพิ่มจากชีวมวลที่มีความสำคัญ โดยกระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกาได้มีการคาดการณ์ว่าจะมีการซื้อขายกันในตลาดทั่วโลกที่ประมาณ 2,420 ล้านดอลลาร์ต่อปี (Werpy และ Petersen, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxypropionic acid

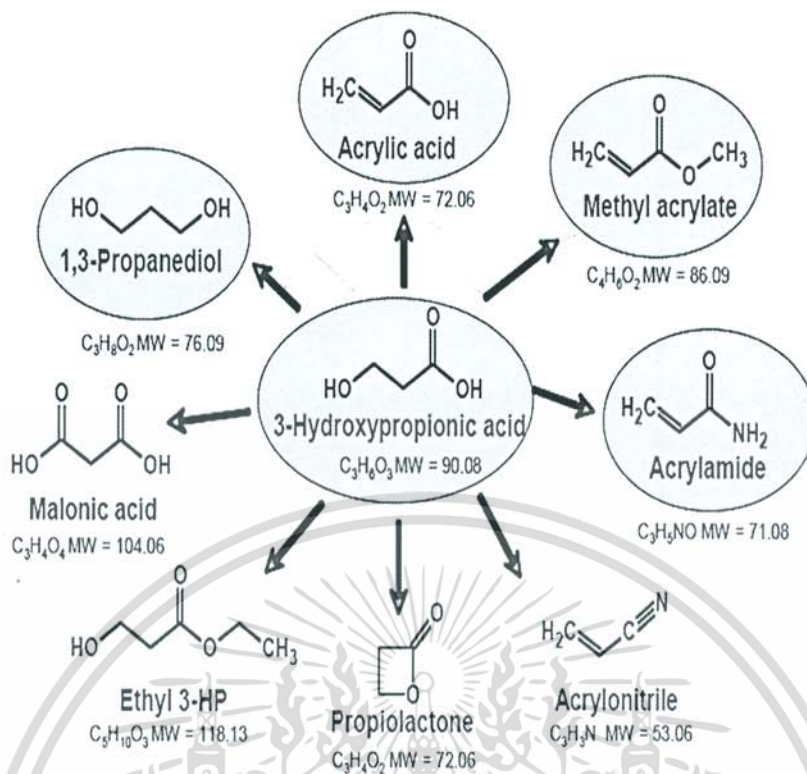
ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:3-Hydroxypropanoic_acid.png

วันที่สืบค้น 15 กันยายน 2558

2.1.2 ความสำคัญของ 3-hydroxypropionic acid

3-hydroxypropionic acid เป็นสารที่น่าสนใจในเชิงการค้าและจัดเป็นสารที่มีความสำคัญลำดับต้นๆ ของ Building Blocks จากทั้งหมด 12 ชนิด เนื่องจาก 3-hydroxypropionic acid ประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบตาจึงเหมาะที่จะใช้ในการสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้งาน อาทิเช่น acrylic acid, 1,3-propanediol (PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-hydroxypropionic acid, malonic acid, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น (ภาพที่ 2.2) สารอนุพันธ์ของ 3-hydroxypropionic acid เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สารเคลือบ สารหล่อลื่น สารป้องกันการเกิดไฟฟ้าสถิตในสิ่งทอ วัสดุตกแต่ง ศัลยกรรม และสารประกอบในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางค์ เป็นต้น (ตารางที่ 2.1) (Kumar และคณะ, 2013; Pina และคณะ, 2011; Zhang และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามในการผลิต 3-hydroxypropionic acid สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ โดยสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพมีหลายชนิด ได้แก่ glycerol, 3-hydroxypropanaldehyde (3-HPA), malonic acid, acrylic acid, 1,3-propanediol (PDO), lactic acid, malonic semialdehyde, acrylamide, allyl alcohol, 3-hydroxypropionitrile และ β -propiolactone (ภาพที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 สารอนุพันธ์ที่ผลิตโดยใช้ 3-hydroxypropionic acid เป็นสารตั้งต้น

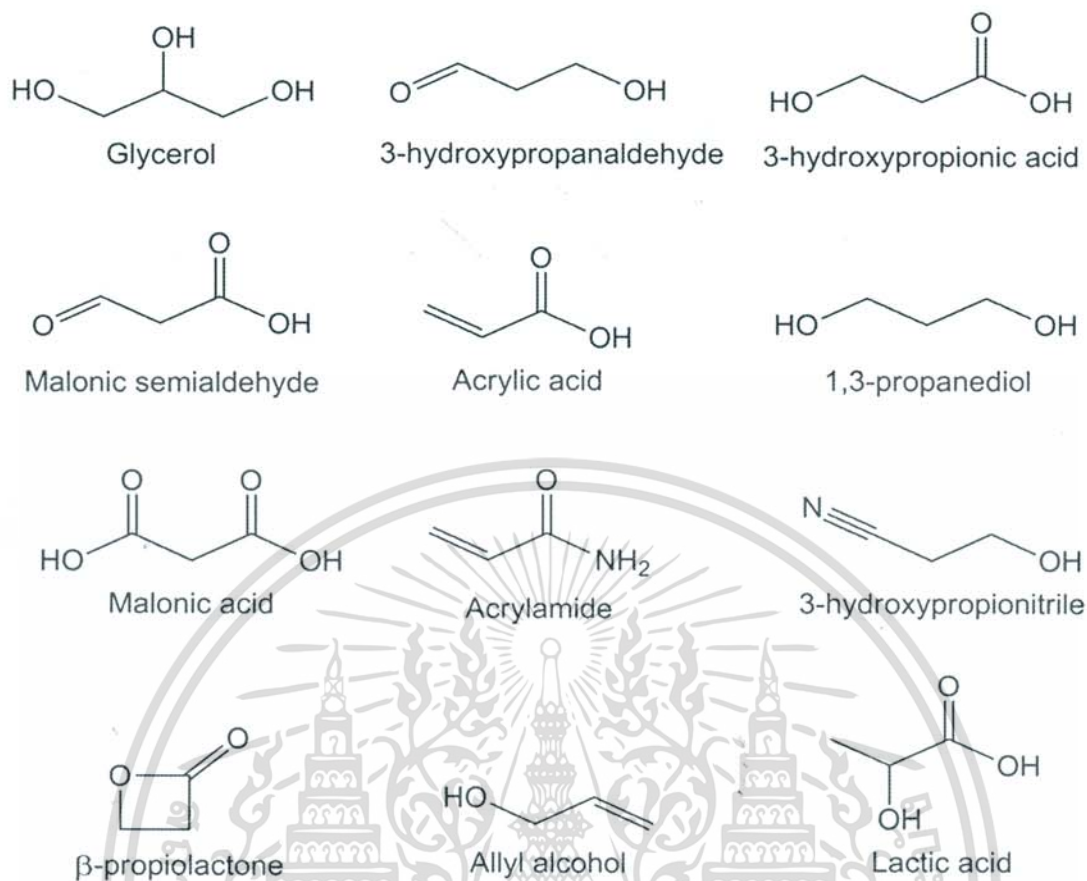
ที่มา : Werpy และ Petersen, 2004

ตารางที่ 2.1 สารอนุพันธ์ของ 3-hydroxypropionic acid

สารอนุพันธ์	กระบวนการเกิด	การนำไปใช้ประโยชน์
กรดอะคริลิก	ดีไฮเดรชัน	อุตสาหกรรมสิ่งทอ สี กระจก กาว โพลีเมอร์
1,3-โพรเพนไดออล	รีดักชัน	ตัวทำละลาย กาว เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เส้นใยและสิ่งทอ
3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนอลดีไฮด์	รีดักชัน	อาหาร ผลิตภัณฑ์เติมแต่งอาหารสัตว์ สารกันบูดในอุตสาหกรรมอาหาร

ที่มา : Jiang และคณะ, 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxypropionic acid และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต

3-hydroxypropionic acid ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

2.2 กระบวนการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธีทางเคมี

2.2.1 กระบวนการออกซิเดชัน 1,3-propanediol ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม

โดยการทำปฏิกิริยาของ 1, 3-propanediol กับแก๊สออกซิเจนในสารละลายต่างโดยมีแพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาปริมาณ 0.1-3.0 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณ 1, 3-propanediol ที่อุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส สามารถสร้างผลผลิต 3-hydroxypropionic acid ในอัตราที่ดี (Behr และคณะ, 1996) สำหรับกระบวนการออกซิเดชันของ 1, 3-propanediol โดยใช้แพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 กระบวนการออกซิเดชัน 1, 3-propanediol ที่มีแพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต 3-hydroxypropionic acid

2.2.2 กระบวนการออกซิเดชัน 3-hydroxypropionaldehyde ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม

โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3-hydroxypropionaldehyde กับแก๊สออกซิเจนในตัวเร่งแพลเลเดียมหรือแพลทตินัมปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) (Haas และคณะ, 2000) สำหรับกระบวนการออกซิเดชัน 3-hydroxypropionaldehyde โดยใช้แพลเลเดียมหรือแพลทตินัมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กระบวนการออกซิเดชันของ 3-hydroxypropionaldehyde ที่มีแพลเลเดียมหรือแพลทตินัมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต 3-hydroxypropionic acid

2.2.3 กระบวนการไฮเดรชัน acrylic acid โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

วิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหาเรื่องของตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งกรดและด่าง แต่การใช้กรดจะเป็นที่นิยมมากกว่า เนื่องจากสารตั้งต้นเป็น Oligomers ซึ่งมีขนาดเล็ก หลังจากกระบวนการ dehydration จะมีกรดอะคริลิกหลงเหลือ ต้องทำการแยกผลิตภัณฑ์โดยวิธีการต่างๆ เช่น การกลั่น การแยกลำดับส่วน การตกผลึก เป็นต้น (Meng และคณะ, 2007) สำหรับปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดอะคริลิกโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 กระบวนการไฮเดรชัน acrylic acid โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ถึงแม้ว่าจะมีกระบวนการทางเคมีในการผลิต 3-hydroxypropionic acid แต่กลับไม่มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ในปัจจุบัน เนื่องจากต้นทุนที่สูงของวัตถุดิบและกระบวนการผลิต รวมถึงปัญหาสิ่งแวดล้อม (Jiang และคณะ, 2009) เนื่องจากแหล่งทรัพยากรในการผลิตสารเคมีเหล่านี้โดยส่วนใหญ่ นั้นมาจากปิโตรเลียมซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้แล้วหมดไป รวมถึงราคาที่ไม่แน่นอนของปิโตรเลียม ด้วยเหตุนี้ทำให้การสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid จากชีวมวลกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเป็นอย่างมาก และเป็นทางเลือกที่สำคัญของภาคอุตสาหกรรม

2.3 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธีทางชีวภาพ

มีความต้องการผลิต 3-hydroxypropionic acid ในเชิงพาณิชย์ ในต้นทุนการผลิตที่ต่ำ และมีกระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ในปัจจุบันยังไม่พบจุลินทรีย์ธรรมชาติที่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปในข้างต้น ดังนั้นจึงมีการสร้างจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม และพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพ เพื่อให้ได้กระบวนการผลิตทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งการใช้การผลิตทางชีวภาพ เมื่อเทียบกับการผลิตด้วยวิธีทางเคมีมีข้อดีดังนี้

1. ลดการพึ่งพาปิโตรเลียมซึ่งมีราคาที่สูง
2. ลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่ชั้นบรรยากาศ
3. ลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม
4. สภาวะที่ใช้ในการผลิตไม่รุนแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการผลิตทางชีวภาพของ 3-hydroxypropionic acid เริ่มต้นตั้งแต่ ค.ศ. 2000 ได้มีการสร้างจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* โดยสามารถใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต 3-hydroxypropionic acid นอกเหนือจากการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและยังมีการพัฒนากระบวนการหมักที่สามารถใช้จริงได้ในปัจจุบัน

2.3.1 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส

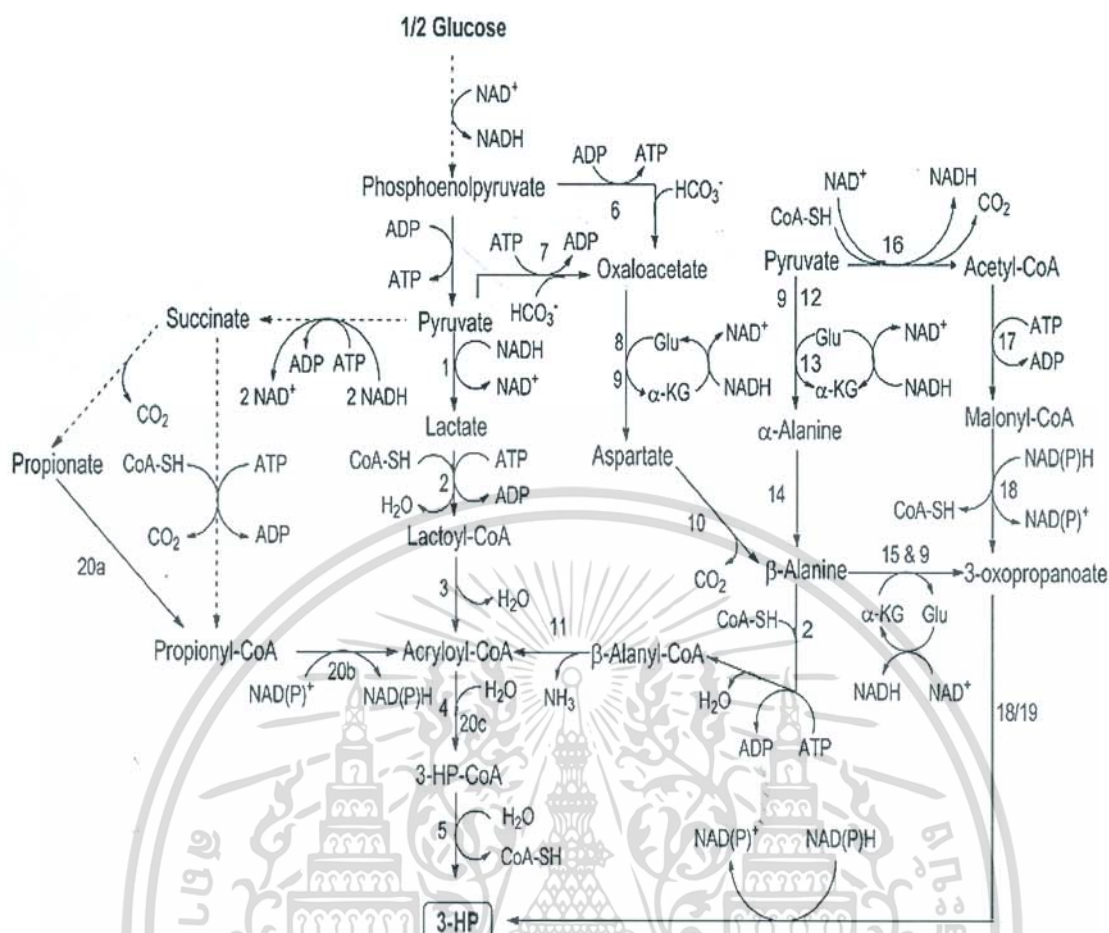
บริษัท Cargill ได้มีการศึกษาและจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับ biochemical pathways ทั้งหมด 7 pathways ที่สำคัญในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส โดยรายละเอียดของแต่ละ pathways แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2 และภาพรวมของทั้ง 7 pathways แสดงดังภาพที่ 2.7

ตารางที่ 2.2 แสดงผลผลิต ATP และความเป็นไปได้ของการเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานเทอร์โมไดนามิกของการใช้กลูโคสในการสร้าง 3-hydroxypropionic acid

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

*^aVaries depending on the route, intermediate (s) and enzyme (s) employed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 วิถีเมตาบอลิซึมในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. lactate dehydrogenase, 2. acetate-CoA ligase/CoA-transferase, 3. lactyl-CoA dehydratase, 4. 3-HP-CoA dehydratase, 5. 3-HP-CoA hydrolase/CoA-transferase/3-hydroxyisobutryl-CoA hydrolase, 6. pyruvate carboxylase/carboxykinase, 7. pyruvate carboxylase, 8. aspartate aminotransferase, 9. glutamate dehydrogenase, 10. aspartate decarboxylase, 11. β -alanine-CoA ammonium lyase, 12. pyruvate-glutamate transaminase, 13. alanine dehydrogenase, 14. alanine 2,3-aminomutase, 15. 4-aminobutyrate aminotransferase/ β -alanine-2-oxoglutarate aminotransferase, 16. pyruvate dehydrogenase complex, 17. acetyl-CoA carboxylase, 18. malonyl-CoA reductase, 19. 3-hydroxyisobutyrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dehydrogenase, 20. เอนไซม์ OS17 ซึ่งประกอบด้วย 3 โดเมน ได้แก่ a-CoA-synthetase, b-dehydrogenase และ c-3-HP dehydratase (Glu: glutamate; α -KG: α -ketoglutarate).

จากตารางที่ 2.2 และภาพที่ 2.7 จะเห็นว่า Pyruvate และ/หรือ phosphoenolpyruvate (PEP) เป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญในวิถีการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส เมื่อกลูโคสถูกออกซิไดซ์จะได้เป็น pyruvate 2 โมล NADH 2 โมล พร้อมทั้งเกิดการสร้าง ATP อีก 2 โมล แต่อย่างไรก็ตามผลผลิต ATP สุทธิที่ได้อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในแต่ละวิถี ตัวอย่างเช่น

Pathway I

pyruvate \rightarrow lactate \rightarrow lactoyl-CoA \rightarrow acryloyl-CoA \rightarrow 3-HP-CoA \rightarrow 3-hydroxypropionic acid

ในวิถีนี้จะมีการผลิต ATP 1 โมล ต่อ 3-hydroxypropionic acid 1 โมล ถ้าปฏิกิริยาการเปลี่ยน lactate ไปเป็น lactoyl-CoA เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ CoA-transferase

Pathway II

pyruvate \rightarrow acetyl-CoA \rightarrow malonyl-CoA \rightarrow 3-oxopropanoate \rightarrow 3-hydroxypropionic acid

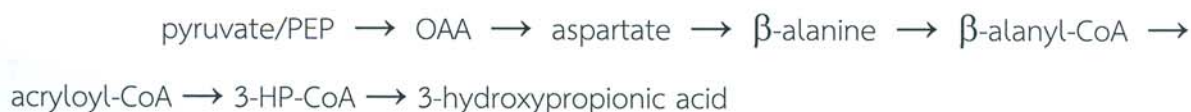
ในการผลิต acetyl-CoA 1 โมล จากกลูโคส จะได้ NADH 2 โมล ATP 1 โมล และ CO₂ 1 โมล ซึ่งในทางตรงข้ามกับการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน (carboxylation) ในการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น malonyl-CoA จะมีการใช้ CO₂ 1 โมล และ ATP 1 โมล และจะมีการนำ NADPH 2 โมล ไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เพื่อเปลี่ยน malonyl-CoA ไปเป็น 3-hydroxypropionic acid ต่อไป (Rathnasingh และคณะ, 2012) ดังนั้นใน Pathway II นี้จึงไม่มี ATP สุทธิเหลืออยู่ และเอนไซม์ malonyl-CoA reductase ก็ไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากขาด NADH เป็นโคแฟกเตอร์

Pathway III

pyruvate/PEP \rightarrow OAA \rightarrow aspartate \rightarrow β -alanine \rightarrow 3-oxopropanoate \rightarrow 3-hydroxypropionic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pathway IV



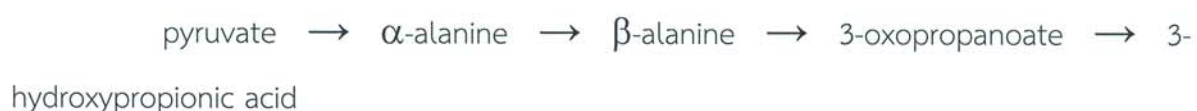
โดยใน pathways III และ IV นั้นมี 3 ขั้นตอนที่เหมือนกัน คือ $\text{pyruvate/PEP} \rightarrow \text{OAA} \rightarrow \text{aspartate} \rightarrow \beta\text{-alanine}$ โดยในการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันเพื่อเปลี่ยน PEP ไปเป็น oxaloacetate นั้นจะได้ ATP 1 โมล ถ้าอาศัยการทำงานของเอนไซม์ PEP carboxykinase แต่ในทางกลับกันจะไม่เกิดการสร้าง ATP เลยเมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ PEP carboxylase นอกจากนี้จะเกิดการผลิต NADH 1 โมล เมื่อกลูโคส 0.5 โมล เปลี่ยนเป็น oxaloacetate. 1 โมล ดังนั้นผลผลิต ATP ขึ้นอยู่กับสารตัวกลาง (pyruvate/PEP) และ/หรือเอนไซม์ที่ถูกใช้ในการเร่งปฏิกิริยา (PEP carboxylase/carboxykinase) นั้นเอง

Pathway V



วิธีนี้จะขึ้นอยู่กับวิถีการหมัก succinic acid และมี propionate เป็นสารตัวกลาง โดย Pyruvate หรือ PEP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น succinate ซึ่ง succinate จะเปลี่ยนต่อไปเป็น propionyl-CoA โดยตรง หรืออาจเปลี่ยนไปเป็น propionate ก่อน จากนั้น propionyl-CoA จะเกิดปฏิกิริยา dehydrogenation โดยมีการกำจัด H ออกไป 2 โมเลกุล ได้เป็น acryloyl-CoA ซึ่งจะถูกไฮเดรตต่อไปเป็น 3-hydroxy propionyl-CoA (3-HP-CoA) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้เป็น 3-hydroxypropionic acid ในที่สุด โดยวิธีนี้จะให้ผลผลิต ATP สุทธิ เท่ากับ -1 แต่ถ้า propionyl-CoA เกิดขึ้นโดยเปลี่ยนของ propionate แล้วผลผลิต ATP สุทธิ จะเท่ากับ -0.33

Pathway VI



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pathway VII



โดยใน pathways VI และ VII ถูกปรับปรุงขึ้นมาเนื่องจากขาดการสร้าง ATP ของ Pathways II, IV และ V โดยผลิต ATP สุทธิต่อ 3-hydroxypropionic acid 1 โมล ใน pathway VI เท่ากับ +1 แต่ในกรณี pathways VII อาจจะเท่ากับ 1 หรือ 0 ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยน β -alanine ไปเป็น β -alanyl-CoA ใช้เอนไซม์ใดในการดำเนินการ

จาก biochemical pathways ที่ถูกคิดค้นขึ้นทั้ง 7 วิธีนี้ พบว่ามี 4 วิธีที่ไม่สามารถเกิดขึ้นเองได้ทางเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamically unfavorable) ได้แก่ pathway I, IV, V และ VII ส่วน 3 วิธีที่เหลือคือ pathway I, II และ VI นั้นสามารถเกิดขึ้นเองได้ทางเทอร์โมไดนามิกส์ และถ้าดูจากวิธีที่สามารถผลิต ATP ได้นั้น pathway VI มีความเป็นไปได้ในการเกิดสูงที่สุด ถึงแม้ว่าใน pathway VI จะมีปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ β -alanine ไปเป็น 3-oxopropanoate ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเกิดขึ้นเองได้ทางเทอร์โมไดนามิกส์ หากไม่ได้รับพลังงาน (ATP) แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง และผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นต่ำ (Mavrovouniotis, 1996) pathway VI นี้ได้รับการตรวจสอบโดยบริษัท Cargill และได้มีการรายงานว่าการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคสโดยใช้ pathway VI ซึ่งสามารถให้ความเข้มข้นและปริมาณผลผลิตที่สูง (Henry และคณะ, 2010; Jiang และคณะ, 2009) ยิ่งไปกว่านั้นในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่าจุลินทรีย์ในธรรมชาติสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *E.coli* และยีสต์บางสายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมเท่านั้นที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคสได้

2.3.2 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล

กลีเซอรอล (glycerol) อาจเรียกว่า กลีเซอริน (glycerine หรือ glycerin) สูตรเคมีคือ $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโพลีออล (polyol) ลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวานเล็กน้อย (ความหวานสัมพัทธ์ 60) มีจุดเดือดที่ 290 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 17.8 องศาเซลเซียส โมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ จึงทำให้ละลายน้ำได้ดี มีสมบัติในการจับกับน้ำได้ดี (hygroscopic) กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบหลักในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งได้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการรวมตัวของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล ได้จากไฮโดรไลซ์น้ำมันจากพืชหรือไขมันจากสัตว์ โดยมีกรดหรือเบสเจือจางเป็นตัวเร่งพร้อมทั้งได้กรดไขมัน ในปฏิกิริยานี้ถ้าใช้เบสแก่เข้าทำปฏิกิริยาเพิ่มจะได้เกลือของกรดไขมันเรียกว่าสบู่ เรียกปฏิกิริยานี้ว่าสaponification) ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ โดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมี ที่ประกอบด้วยกรดไขมันและกลีเซอรอล เมื่อไตรกลีเซอไรด์รวมตัวกับสารเร่งปฏิกิริยาชนิดที่เป็นด่าง เช่นโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกินพอจะทำให้เกิดการรวมพันธะของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ เกิดเป็นไบโอดีเซล (Biodiesel) และกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ จากปฏิกิริยาที่เรียกว่า transesterification โดยที่ R คือ คาร์บอน 16-18 อะตอม ซึ่งมีพันธะคู่ระหว่าง C = C ตั้งแต่ 1-3 คู่

ในกระบวนการทางชีวภาพของกลีเซอรอลนั้น มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถใช้กลีเซอรอลทั้งในการย่อยแบบใช้อากาศและแบบไม่ใช้อากาศ ดังนั้นจึงมีการนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นสารตั้งต้น (แหล่งคาร์บอน) เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่า โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula* และ *Enterobacter aerogenes* โดยที่ภายใต้สภาวะไม่ใช้อากาศจะสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นก๊าซไฮโดรเจน และเอทานอล (Joshson และ Taconi, 2007) นอกจากนี้ การหมักแบบไม่ใช้อากาศยังสามารถผลิต 1,3-propanediol (PDO) และผลิตภัณฑ์ร่วมเช่น acetic acid, butyric acid, buthanol, acetone, lactic acid, succinic acid, formate และ 2,3-Butanediol เป็นต้น

ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็นสารเคมีที่มีปริมาณมากและสามารถถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารเคมีมูลค่าสูง โดยอาศัยการหมักของจุลินทรีย์ เช่น 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, ethanol, succinic acid และ 3-hydroxypropionic acid เป็นต้น กระบวนการหมักกลีเซอรอลสามารถผลิตได้ผลตอบแทนที่สูงกว่ากระบวนการหมักของน้ำตาลทั่วไป การเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$; $k = 4.67$) ไปเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) หรือ pyruvate โดยสารทั้งสองจะถูกผลิตขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$; $k=4$) หรือไซโลส ($C_5H_{10}O_5$; $k=4$) นอกจากนี้กลีเซอรอลที่ผลิตโดยการหมักของจุลินทรีย์และที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสบู่และไบโอดีเซลซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้มีราคาถูกกว่ามากเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส และข้อได้เปรียบเหล่านี้เองจึงทำให้กลีเซอรอลได้กลายเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตสารเคมีต่างๆ ผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ สำหรับคุณสมบัติต่าง ๆ ของกลีเซอรอลนั้นแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

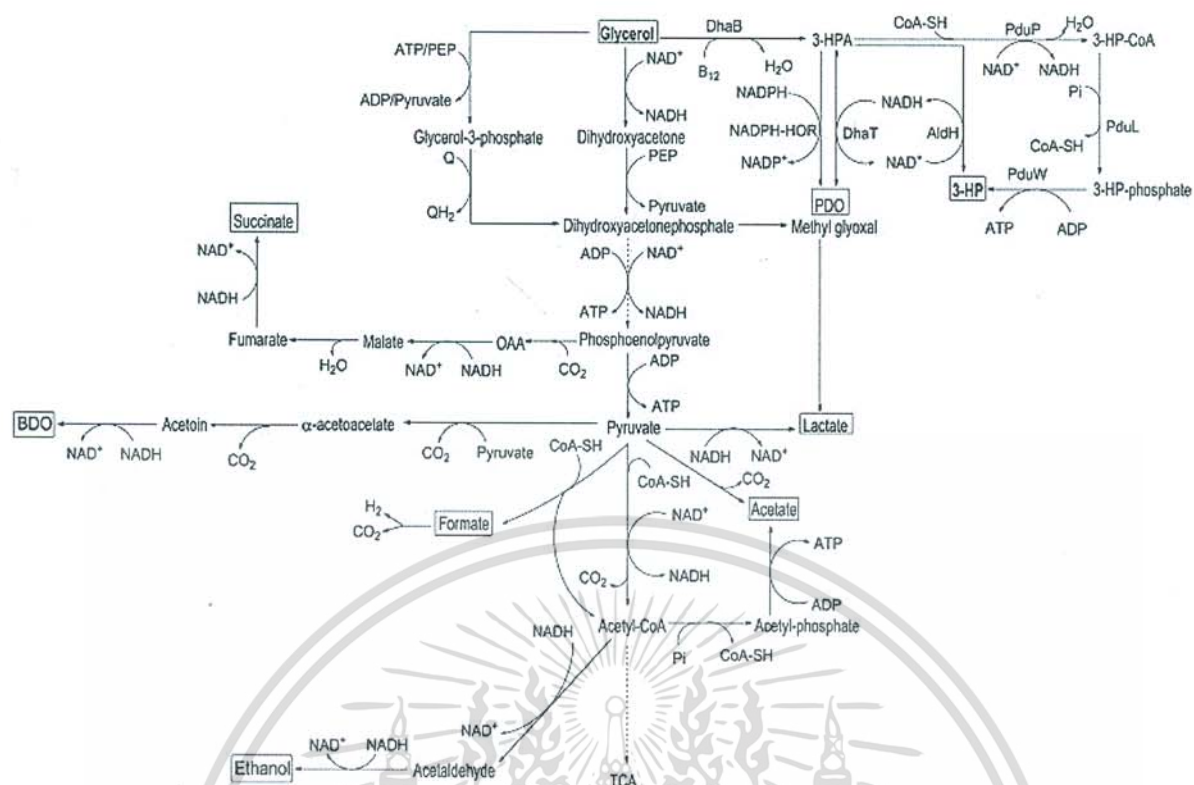
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงคุณสมบัติของกลีเซอรอล

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

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่เจริญส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย ได้แก่ *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Lactobacillus* สามารถใช้กลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถผลิต propanediol (PDO) เป็นผลิตภัณฑ์ร่วม และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *K. pneumonia*, *L. reuteri* และ *L. collinoides* สามารถสร้าง 3-hydroxypropionic acid ได้โดยการออกซิโดซ์ 3-HPA พร้อมกับการสร้าง PDO (Garai-Ibabe และคณะ, 2008; Krauter และคณะ, 2012; Sobolov และคณะ, 1960; Talarico และคณะ, 1988) โดยการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลประกอบไปด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ผ่าน 2 pathway ได้แก่ CoA-dependent pathway และ CoA-independent pathway แสดงดังภาพที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



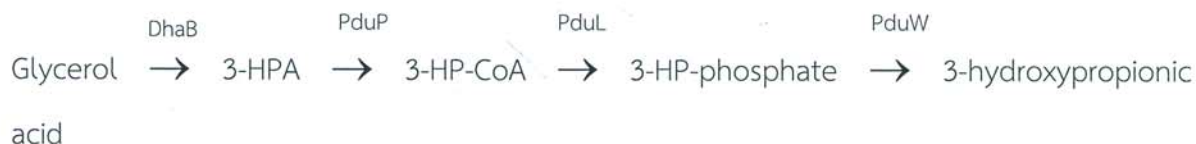
ภาพที่ 2.8 แสดง Metabolic pathways ในกระบวนการเมตาบอลิซึมกลีเซอรอล ผ่าน 2 pathway ได้แก่ CoA-dependent pathway และ CoA-independent pathway

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

2.3.2.1 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-dependent pathway

วิถี CoA-dependent pathway เกิดขึ้นจากการ degradation สาร 1,2-propanediol (1,2-PDO) ซึ่งสามารถพบได้ใน *Salmonella enterica* (Leal และคณะ, 2003) ซึ่ง 1,2-PDO จะถูกเปลี่ยนไปเป็น propionaldehyde ด้วยเอนไซม์ B12-dependent diol dehydratase (DhaB) จากนั้น propionaldehyde จะเกิด disproportionation ได้ผลิตภัณฑ์เป็น propanol และ propionic acid โดยอาศัยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน เช่น propanol dehydrogenase, coenzyme A (CoA)-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP), phosphotransacylase (PduL) และ propionate kinase (PduW) และจะได้ ATP เป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงของการเกิด dephosphorylation ของการเปลี่ยน propionyl phosphate ไปเป็น propionate (ภาพที่ 2.8) โดยกลุ่มยีนทั้งหมดที่จำเป็นสำหรับการเมตาบอลิซึม 1,2-PDO ของ *S. enterica* อยู่บนตำแหน่งที่เรียกว่า propanediol utilization (*pdu*) (Leal และคณะ, 2003; Liu และคณะ, 2007; Xue และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังพบวิธีการผลิตเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นนี้ได้ใน *K. pneumonia*, *L. reuteri* และ *L. collinoides* อีกด้วย (Luo และคณะ, 2012) ในกรณีของวิถี CoA-dependent pathway นี้ลำดับปฏิกิริยาต่าง ๆ เป็นดังนี้



จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* sp. (*L. strain* 208-A, *L. reuteri* และ *L. collinoides*), *S. enteric* และ *K. pneumoniae* มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิถี CoA-dependent pathway

Yasuda และคณะ (2007) รายงานว่า resting cells ของ *L. reuteri* สายพันธุ์กลายที่ไม่มีเอนไซม์ glycerol dehydrogenase สามารถผลิต PDO 7.2 กรัม/ลิตร และ 3-hydroxypropionic acid 8.5 กรัม/ลิตร

Luo และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาคูสมบัติของเอนไซม์ propionaldehyde dehydrogenase (PduP) จาก *L. reuteri* พบว่าเอนไซม์ PduP มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นในกลุ่ม aliphatic aldehydes รวมถึง 3-HPA และสามารถใช้น้ำ NAD⁺ และ NADP⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ ในการทดสอบสารตั้งต้นพบที่มีความจำเพาะสูงที่สุดกับ propionaldehyde โดยมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.18 มิลลิโมลาร์ และ 0.35 หน่วย/มิลลิกรัม ตามลำดับ ที่ 37 องศาเซลเซียส pH 7.8 นอกจากนี้ยังพบว่า *K. pneumoniae* มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล โดยใช้กลุ่มเอนไซม์ใน pdu operon (Luo และคณะ, 2012) โดยสายพันธุ์กลายสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ในระดับเดียวกับสายพันธุ์ปกติ (wild type) แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมเมแทบอลิก (metabolic activity) ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้การเกิดการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) ของยีน pduP มีส่วนในการเพิ่มการผลิต 3-hydroxypropionic acid ยืนยันได้จากที่เอนไซม์ PduP มีส่วนร่วมในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ใน *K. pneumoniae*

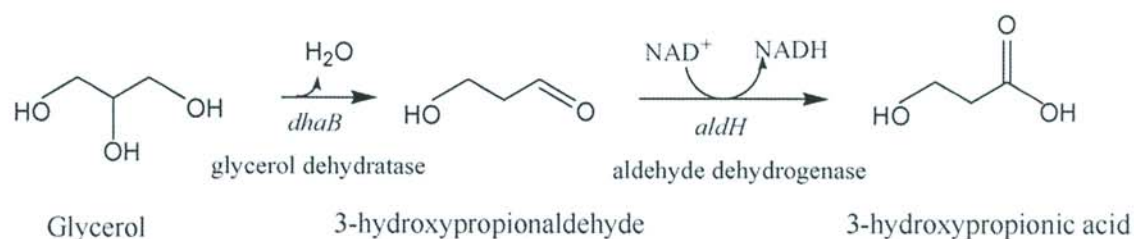
Luo และคณะ (2012) พบว่า *K. pneumoniae* สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน pduP และ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ปกติ มีระดับการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันจนถึงชั่วโมงที่ 15 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 15 มีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสายพันธุ์กลายอย่างเห็นได้ชัด โดยสายพันธุ์กลายมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ประมาณ 1.0 กรัม/ลิตร ในเวลา 15 ชั่วโมง และไม่มีการผลิตต่อ ในขณะที่สายเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ปกติมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid อย่างต่อเนื่องประมาณ 2.0 กรัม/ลิตร ในเวลา 25 ชั่วโมง ในกรณีของสายพันธุ์กลายที่มีปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ต่ำ และเกิดการตายของเซลล์ น่าจะเป็นผลมาจากการสะสมความเป็นพิษจาก intermediate metabolite 3-HPA (~6 mM) ซึ่งเมื่อเกิด overexpression ของยีน *pduP* ในสายพันธุ์กลาย พบว่าระดับของการเมตาบอลิซึมกลีเซอรอลอยู่ในระดับปกติ แต่ระดับของ 3-hydroxypropionic acid ลดลง และเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง

2.3.2.2 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-independent pathway

สำหรับวิถี CoA-independent pathway นั้นขั้นตอนแรกจะเป็นการเปลี่ยน glycerol ไปเป็น 3-HPA โดยอาศัยเอนไซม์ B12-dependent diol dehydratase (DhaB) เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยานี้สามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้เอนไซม์ Glycerol dehydratase (GDHT) ซึ่งเอนไซม์ GDHT ใน pathway นี้ไม่ต้องการวิตามิน B12 เป็น Coenzyme แต่อย่างไรก็ตาม GDHT ยังไม่มีการนำไปใช้ในการผลิต 3-hydroxypropionic acid เพราะค่อนข้างไวต่อออกซิเจน ดังนั้นการผลิต 3-hydroxypropionic acid จะต้องดำเนินการภายใต้สภาวะการจำกัดการให้อากาศ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่จำเป็นต่อ pathway นี้อีกชนิดหนึ่งคือ aldehyde dehydrogenase (ALDH) ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3-HPA ไปเป็น 3-hydroxypropionic acid การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ต้องการ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ และเอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิด เช่น *K. pneumonia* และ *Lactobacillus sp.* สามารถพบเอนไซม์ ALDHs แต่กิจกรรมของการทำงานยังไม่สูงมากนัก ดังนั้นการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ ALDHs ที่สูงจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล โดยความแตกต่างจากวิถี CoA-dependent pathway กล่าวคือวิถี CoA-independent pathway จะไม่มีการผลิต ATP และไม่ต้องการ coenzyme A แต่ทั้ง 2 pathway มีความต้องการโคแฟกเตอร์ที่เหมือนกันคือ NAD^+ ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการ oxidative metabolism ของกลีเซอรอลและ/หรือในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนั่นเอง สำหรับการสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid โดยวิถี CoA-independent pathway นั้น แสดงดังภาพที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



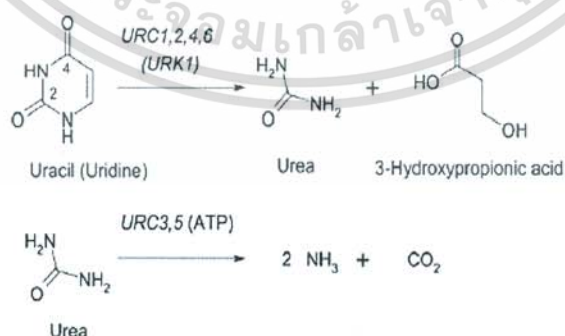
ภาพที่ 2.9 แสดงการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิถี CoA-independent pathway

ที่มา : Raj และคณะ, 2008

2.3.3 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยการย่อยสลาย acrylic acid และ uracil

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเปลี่ยน acrylic acid ไปเป็น 3-hydroxypropionic acid ได้ (Takamizawa และคณะ, 1993) เช่น *Byssoschlamys* sp. สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid (4.8 % v/v) จาก acrylic acid นอกจากนี้ยังพบว่ามี การสะสมของ 3-hydroxypropionic acid ชั่วคราวในระหว่างการย่อยสลาย acrylic acid โดยเชื้อรา *Geotrichum* sp. และ *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากกากตะกอนโรงบำบัดน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

นอกจากนี้ 3-hydroxypropionic acid สามารถเกิดได้จากการการย่อยสลาย uracil ซึ่งเป็น pyrimidine base โดย Andersen และคณะ (2008) พบว่าในระบบการย่อยสลาย uracil ซึ่งเป็นอิสระจากระบบทางเดินหายใจของ *Saccharomyces kluyveri* นั้น พบสารหลายชนิดได้แก่ uridinemonophosphate ยูเรีย แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ และ 3-hydroxypropionic acid เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลาย uracil และสันนิษฐานว่า 3-hydroxypropionic acid ถูกสร้างจาก malonicsemialdehyde โดยใช้เอนไซม์ reductase (ดังภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยอาศัยกระบวนการย่อยสลาย uracil

ที่มา : Andersen และคณะ, 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

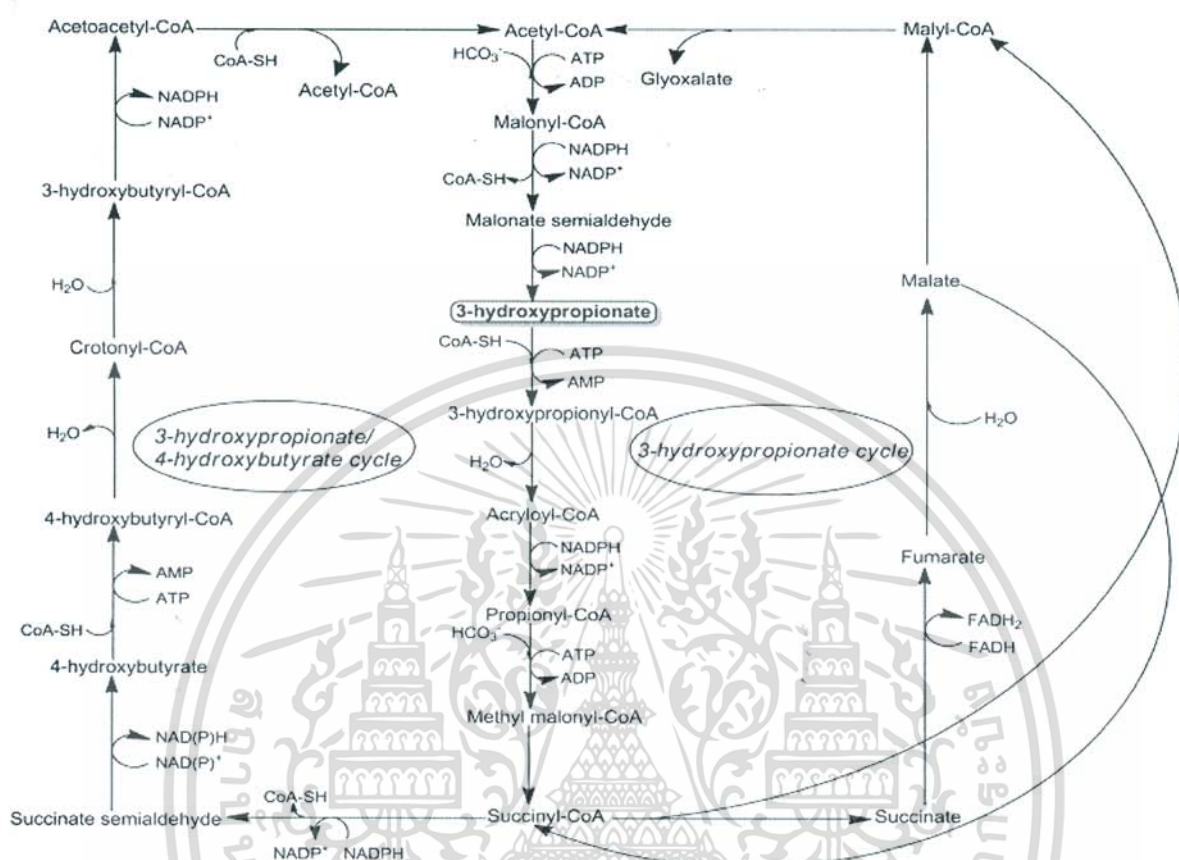
โดย (N1-C2-N3) ถูกปล่อยออกมาในรูปของยูเรีย และถูกย่อยสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ ATP-dependent ureaamidolyase ส่วน (C4-C5-C6) ถูกปล่อยออกมาในรูปของ 3-hydroxypropionic acid

2.3.4 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate

3-hydroxypropionic acid เป็นสารตัวกลางในวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (ภาพที่ 2.11) ซึ่งเป็นวัฏจักรหนึ่งที่ได้พบได้ในแบคทีเรียจำพวก autotrophic บางชนิดที่สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Fuchs, 2011; Saini และคณะ, 2011) เช่น *Chloroflexus aurantiacus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ทนความร้อน โดยแบคทีเรียดังกล่าวจะผลิต 3-hydroxypropionic acid ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้มีจำนวนน้อยเพียง 1.5 ไมโครโมลาร์ แต่สามารถปรับปรุงให้มีการผลิตสูงขึ้นได้โดยการเติม acetate หรือ KCN ลงไปในอาหาร แต่ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จำนวนสูงที่สุดเท่ากับ 350 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจะพบได้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี propionate (Holo, 1989) นอกจากนี้ยังพบวัฏจักรดังกล่าวนี้ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera sedula*, *Acidianus ambivalens*, *Sulfolobus* sp. strain VE6 และ *Sulfolobus metallicus* (Hügler และคณะ, 2003; Saini และคณะ, 2011) สำหรับวัฏจักร 3-Hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (ภาพที่ 2.11) ถูกพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Metallosphaera sedula* โดยวิถีเมตาบอลิซึมของทั้งสองวัฏจักรนี้อาศัยเอนไซม์ biotin-dependent acetyl-CoA carboxylase และเอนไซม์ propionyl-CoA carboxylase ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยวิถีเมตาบอลิซึมเริ่มต้นด้วยการเกิด carboxylation ของ acetyl-CoA ไปเป็น malonyl-CoA โดยอาศัยเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase และมีการใช้ ATP 1 โมเลกุล จากนั้น Malonyl-CoA จะเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionic acid โดยผ่าน malonate semialdehyde ซึ่งเป็นสารตัวกลาง และมีการใช้ NADPH 2 โมเลกุล ซึ่ง 3-hydroxypropionic acid จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น propionyl-CoA และการเกิดกระบวนการ carboxylation ต่อไปจนได้ methylmalonyl-CoA และจะเกิดกระบวนการไฮโซเมโรไลซ์ของ methylmalonyl-CoA กลายเป็น succinyl CoA ในที่สุด และภายหลังจากนี้วัฏจักรทั้งสองก็จะมีวิถีเส้นทางที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าหาก 3-hydroxypropionic acid สามารถผลิตได้จากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นั้นจะกลายเป็นที่น่าสนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีอยู่ในอากาศและสามารถนำไปใช้ได้อย่างง่ายดาย นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกซึ่งถือเป็นปัจจัยที่สำคัญของต้นทุนการผลิตอีกด้วย (Jiang และคณะ, 2009)



ภาพที่ 2.11 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิถี autotrophic ผ่านวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

2.4 ความเป็นพิษของ 3-hydroxypropionic acid

โดยทั่วไปความเป็นพิษของกรดอินทรีย์จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยกรดอินทรีย์ต่างๆเหล่านี้หากอยู่ภายในเซลล์จะไปทำลายสมดุลความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ และการแลกเปลี่ยนไอออนในไซโตพลาสซึม ความเป็นกรดที่เกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมนี้จะส่งผลให้เบสเพียวรีนเกิดการกระบวน denaturing ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญไม่สามารถถูกสร้างขึ้นและสิ่งมีชีวิตนั้นก็จะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ต่อไป สภาวะความเป็นกรดในไซโตพลาสซึมยังส่งผลกระทบต่อเซลล์อีกมากมาย ได้แก่ ความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารอาหารและการสร้างพลังงานภายในเซลล์ การรักษาเอกสารเป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมดุลของความเป็นกรด-ด่างในไซโตพลาสซึม และการปกป้องโปรตีนและดีเอ็นเอภายในเซลล์ (Booth และคณะ, 2002; Roe และคณะ, 2002; Warnecke และ Gill, 2005)

การส่งกรดอินทรีย์ออกนอกเซลล์ต้องใช้พลังงานสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกของกรดในสถานะที่มีค่าพีเอชต่ำ โดย van Maris และคณะ (2004) พบว่าที่พีเอชต่ำจำเป็นต้องใช้พลังงานในการขนส่งผลิตภัณฑ์ออกนอกเซลล์เท่ากับหรือสูงกว่ากระบวนการเผาผลาญพลังงานเพื่อใช้สร้างผลิตภัณฑ์ 3-hydroxypropionic acid และแลคเตท (Van Maris และคณะ, 2004) ก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการเผาผลาญพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการทำงานที่สำคัญของเซลล์ ซึ่งจะเกิดความเสียหายอย่างร้ายแรงต่อระบบเผาผลาญของเซลล์และทำให้เซลล์นั้นไม่สามารถรักษาหรือซ่อมแซมตัวเองได้และจะต้องตายไปในที่สุด ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของกรดสามารถแก้ไขได้บางส่วนโดยการดัดแปลงจุลินทรีย์ให้มีลักษณะทนต่อสถานะพีเอชต่ำและสามารถหมักได้ในสถานะพีเอชต่ำกว่าค่า pKa ของกรด (Warnecke และ Gill, 2005) รวมถึงการใช้ต่างเป็นตัวเพิ่มพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก แต่อาจไปลดการเกิด 3-hydroxypropionic acid นอกจากนี้ความเป็นกรดยังเป็นสิ่งรบกวนการทำงานของไอออนที่จำเพาะเจาะจงกับกระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ โดยความเป็นพิษของ 3-hydroxypropionic acid จะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งวิถีของ chorismate และ threonine อย่างไรก็ตามมีการทดสอบความทนทานต่อความเป็นกรดของแบคทีเรียที่ผ่านการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในวิถี chorismate และ threonine ที่บริเวณแตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความทนต่อความเป็นกรดมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเติมสารเมตาบอไลต์ที่เกี่ยวข้องกับวิถี chorismate และ threonine ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Warnecke และคณะ, 2012)

3-hydroxypropionic acid มีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นเดียวกับกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยในช่วงระยะการเจริญเติบโตช่วงปลายของเชื้อ *K. pneumonia* และ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการตัดต่อยีนส์ พบว่ามีอัตราการผลิต 3-hydroxypropionic acid สูงถึง 200-300 มิลลิโมลาร์ แต่การผลิตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติม 3-hydroxypropionic acid ลงในอาหารอย่างต่อเนื่อง และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์รวมถึงการใช้กลีเซอรอลและการผลิต 3-hydroxypropionic acid นั้นลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน (Kumar และคณะ, 2012; Ashok และคณะ, 2013; Rathnasingh และคณะ, 2009) นอกจากนี้ได้มีการทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบความสัมพันธ์ของการเกิดผลิตภัณฑ์ 3-hydroxypropionic acid กับปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ถูกเติมลงไปจากภายนอก พบว่าเมื่อเติม 3-hydroxypropionic acid ที่ความเข้มข้น 0, 120, 270, 530 และ 790 ไมโครโมลาร์ มีการผลิต 3-เอกซารันเป็นเอกซารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นานเกินไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

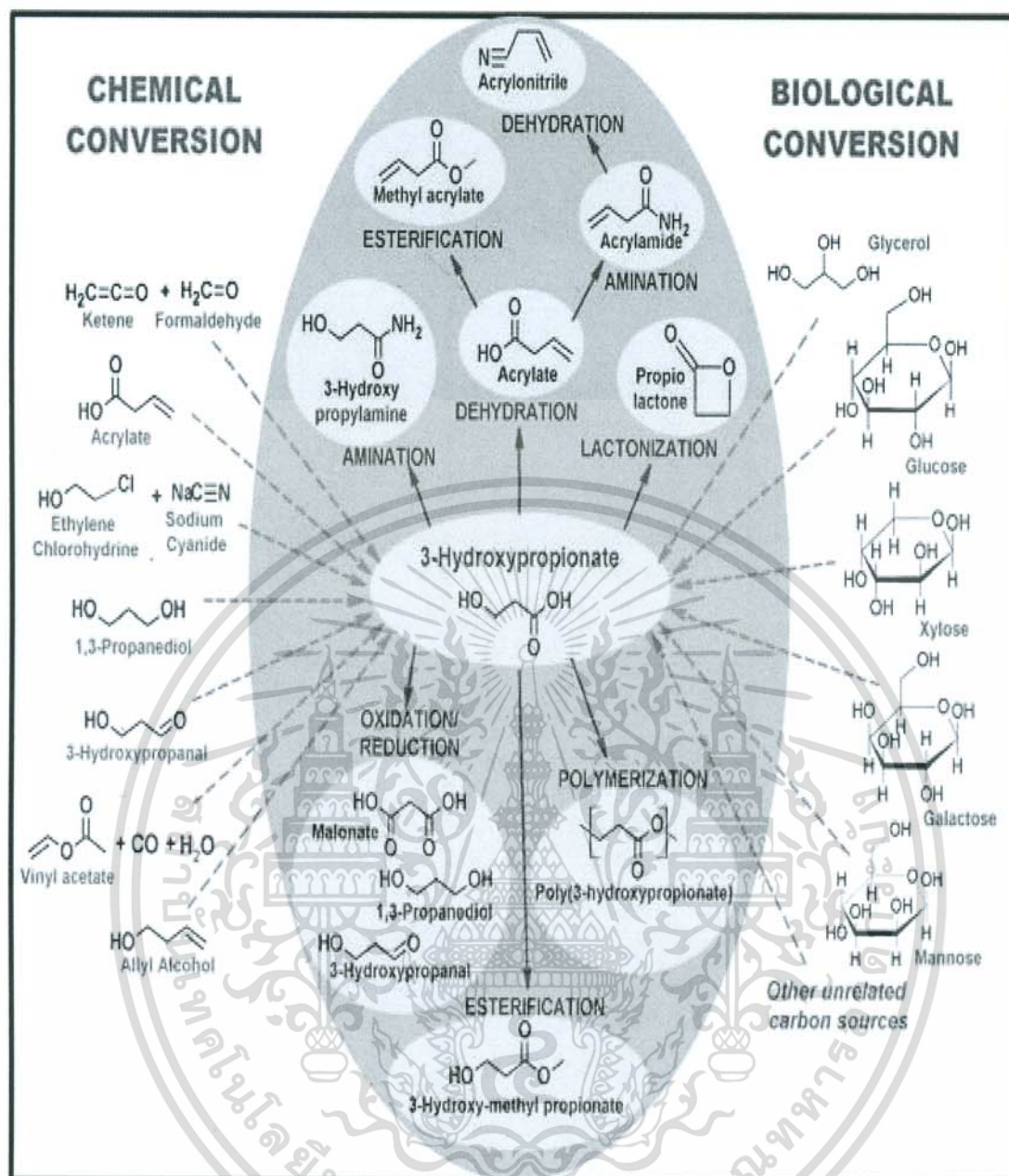
hydroxypropionic acid เท่ากับ 27.5, 17.7, 10.8, 6.2 และ 7.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า อัตราการผลิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด

อย่างไรก็ตามจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีและการวิเคราะห์จีโนมิกในปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้ในเพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ศึกษาสารประกอบที่เป็นพิษ และศึกษากลยุทธ์ต่างๆที่สามารถยับยั้งสารพิษได้ (Dunlop, 2011; Jarboe และคณะ, 2011) โดยกลยุทธ์ที่ใช้ในการปรับปรุงความทนทานต่อสารพิษประกอบด้วย ระบบการขนส่งสารของเซลล์ การปรับเปลี่ยนเมมเบรน และการตอบสนองต่อแรงกดดัน เป็นต้น (Alper และคณะ, 2006)

2.5 การนำ 3-hydroxypropionic acid ไปประยุกต์ใช้งาน

3-hydroxypropionic acid จัดเป็นสาร building blocks อันดับที่สามจากทั้งหมด 12 อันดับ ซึ่งคัดเลือกโดย US Department of Energy (DOE) (Werpy and Petersen, 2004) สามารถสร้างได้จากการเปลี่ยนแปลงสารชีวมวล ใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่หลากหลาย สารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ใช้เป็นตัวกลางในการผลิตสารเคมี เช่น acrylic acid, 1, 3-propanediol(PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-hydroxypropionic, malonic acid, propiolactone acrylonitrile (ภาพที่ 2.12) นอกจากนี้ 3-hydroxypropionic acid ยังใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์เคลือบโพลีเมอร์ ผลิตภัณฑ์หล่อลื่นและสารป้องกันไฟฟ้าสถิตสำหรับสิ่งทอ หรืออาจใช้เป็นวัสดุสำหรับปฏิกิริยา cyclization และปฏิกิริยา polymerization ในการผลิต propiolactone, polyesters และ oligomers โดยเฉพาะโพลีเมอร์ที่ผลิตได้จากการกลั่นตัวของ 3-hydroxypropionic acid ที่เรียกว่า poly 3-hydroxypropionic acid ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับการผ่าตัดและยา ซึ่งถือว่าเป็นสิ่งใหม่ที่เริ่มเกิดขึ้นในวงการแพทย์ และ poly 3-hydroxypropionic acid ยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและเป็นพอลิเมอร์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้แทนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปิโตรเลียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.12 สารตั้งต้นทางเคมีและทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid

และผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก 3-hydroxypropionic acid

ที่มา: Valdehuesa และคณะ, 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง

- 3.1.1 กลีเซอรอล (Glycerol) Fisher chemical, ประเทศอังกฤษ
- 3.1.2 แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.1.4 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.1.5 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) Scharlau, ประเทศสเปน
- 3.1.6 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.1.7 กรดซิตริก (Citric acid) AnalaR[®], ประเทศอังกฤษ
- 3.1.8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.1.9 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.10 โคบอลต์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.1.11 แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.12 กลูโคส (glucose) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.1.13 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.14 ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.15 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.16 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.17 เปปโตน (peptone) Srichem, ประเทศจีน
- 3.1.18 สารสกัดเนื้อ (meat extract) Biomark, ประเทศจีน
- 3.1.19 สารละลายแร่ธาตุ (trace element solution)
- 3.1.20 วัุ้น (Agar)
- 3.1.21 ซีสเตอีน-ไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)
- 3.1.22 คาเซอีน เปปโตน (casein peptone)
- 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
- 3.2.1 หลอดดูดจ่ายสารละลาย (Microcentrifuge Tube)
- 3.2.2 ทิปสำหรับเครื่องดูดจ่ายสาร (Micropipette Tip)
- 3.2.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette) ยี่ห้อ ViPro บริษัท Vivantis Technologies, USA
- 3.2.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท BINDER, Germany
- 3.2.5 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubation Shaker)
- 3.2.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น TE214S บริษัท Sartorius Weighing Technology, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Microcentrifuge) รุ่น 16M บริษัท Labnet International, USA
- 3.2.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy
- 3.2.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S UV-Vis บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
- 3.2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท Memmert, Germany
- 3.2.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
- 3.2.12 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Hirayama, Japan
- 3.2.13 ตู้ลามินาร์ (Laminar Air Flow Carbinet) บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
- 3.1.14 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS บริษัท Olympus Corporation, Japan
- 3.2.15 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) ยี่ห้อ HOLLYWOOD บริษัท Hollywood International, Japan
- 3.2.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Memmert, Germany
- 3.2.17 สไลด์สำหรับส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Sail บริษัท Yancheng Xingfu Glass Instrument Factory, China
- 3.2.18 กระจกปิดสไลด์ยี่ห้อ Menzel-Glaser บริษัท Gerhard Menzel, Germany
- 3.2.19 กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand
- 3.2.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.21 ลูบสำหรับเชยเชื้อ
- 3.2.22 ที่วางหลอดทดลอง (Lack)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.23 จุกยาง

3.2.24 ขวดไวแอล ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.25 ตัวกรองที่มีขนาดช่องผ่าน 0.45 ไมครอน

3.2.26 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ

3.3.1.1 อาหารเหลวสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ (M9 broth) (Arasu และคณะ, 2011) มีส่วนประกอบ ดังนี้

กลีเซอรอล (Glycerol)	20.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.25	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.0	กรัมต่อลิตร

3.3.1.2 อาหารแข็งสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ (M9 agar) มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร M9 broth แต่มีการเติม

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	10.0	กรัมต่อลิตร
วุ้น (Agar)	20.0	กรัมต่อลิตร

3.3.2 อาหารสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

3.3.2.1 MRS broth ดัดแปลงจาก Chang และ คณะ (2001) มีส่วนประกอบดังนี้

กลีเซอรอล (Glycerol)	20.0	กรัมต่อลิตร
----------------------	------	-------------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปปโติน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (meat extract)	8	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัมต่อลิตร
dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัมต่อลิตร
diammonium hydrogen citrate	2	กรัมต่อลิตร
sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
magnesium sulfate	0.2	กรัมต่อลิตร
manganese sulfate	0.05	กรัมต่อลิตร
3.3.2.2 MRS agar มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร MRS broth แต่มีการเติม		
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO ₃)	10.0	กรัมต่อลิตร
วุ้น (Agar)	20.0	กรัมต่อลิตร

3.4 แหล่งเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินหรือน้ำเสียจากบริเวณที่คาดว่ามีการสะสมของไขมันเป็นเวลานาน โดยเก็บตัวอย่างที่ความลึก 0-10 เซนติเมตร จากทุกจุดให้กระจายทั่วบริเวณในปริมาณเท่ากัน แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างรวมเพื่อใช้เป็นตัวแทนของแหล่งดินหรือน้ำเสียจากทั้งบริเวณ

3.5 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและผลิตกรดได้

นำตัวอย่างดินและตะกอนจากถังบำบัดน้ำเสียปริมาณ 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate บนอาหารแข็งที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO₃) 10 กรัมต่อลิตร (Tabuchi และคณะ, 1981) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสังเกตเห็นจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสขึ้นโดยรอบโคโลนี นำโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวไปทำการ Cross streak ลงในอาหารแข็งอีก 1-2 ครั้ง เพื่อคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure cultures) สำหรับนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทลงในอาหารเหลวปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth และจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Arasu และคณะ, 2011) เพื่อแยกตะกอนเซลล์ จากนั้นกรองส่วนใสอีกครั้งด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และนำส่วนใสที่ได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้นของกรด 3-hydroxypropionic ในน้ำเลี้ยงถูกตรวจสอบโดยเครื่อง HPLC รุ่น LG-20A ของบริษัท Shimadzu โดยใช้คอลัมน์ BP-0A จากบริษัท Benson polymeric ที่มีความขนาด 300 x 7.8 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ที่มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน Colum oven ทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดค่าด้วย Detector คือ UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร (Huang และคณะ, 2013)

3.8 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ (จารุณี เกสรพิกุล และสุรวัดน์ ชลอสันติสุข, 2554)

ทำ Gram staining เพื่อศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ และเพื่อจำแนกว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้นั้นจัดเป็น Gram-positive หรือ Gram-negative โดยเริ่มจากการ Fix จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ลงบนแผ่นสไลด์ ด้วยการนำจุลินทรีย์มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดเล็กๆ จากนั้นเกลี่ยจุลินทรีย์ให้เป็นฝ้าบางๆ (Smear) ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเพื่อให้จุลินทรีย์ติดแน่นบนแผ่นสไลด์ จากนั้นทำการหยด Crystal violet ลงไปจนท่วมบริเวณที่ Smear ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลายไอโอดีนจนท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออก จากนั้นค่อยๆ หยด 95% Ethanol เอียงสไลด์ไปมาจนกระทั่งสีน้ำเงินเริ่มจาง แต่อย่าให้นานเกิน 20 วินาที แล้วจึงรีบล้างออกด้วยน้ำสะอาด แล้วจึงทำการย้อมทับอีกครั้งด้วย Safranin ให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้งแล้วจึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารแข็งโดยดูสี รูปร่าง ความหนืด ขอบ และลักษณะเนื้อสัมผัสของโคโลนี

สำหรับการจำแนกจุลินทรีย์ทำตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1986) และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของจุลินทรีย์กับฐานข้อมูลของจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases)

3.9 การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลบริสุทธ์ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับปริมาณกล้าเชื้อให้เหมาะสม (โดยปรับค่า OD ให้มีค่าประมาณ 0.8 ซึ่งค่า OD = 0.8 มีเซลล์ประมาณ 1.4×10^6 CFU/ml) นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ไปเติมลงในอาหารเหลว โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการตรวจสอบหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ซึ่งการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทำได้โดยการนำตัวอย่างมาทำ 10 fold dilution แล้วนำไป spread บนอาหารแข็ง ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธ์ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีเดี่ยวในช่วง 30-300 โคโลนี เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อต่อไป และการตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองผ่านตัวกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

3.10 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกในอาหารเหลว โดยมีการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับจุลินทรีย์เริ่มต้นเตรียมโดยปรับความขุ่นของจุลินทรีย์ให้มีค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 จากนั้นเติมจุลินทรีย์ที่ได้ลงในอาหารเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อที่ 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

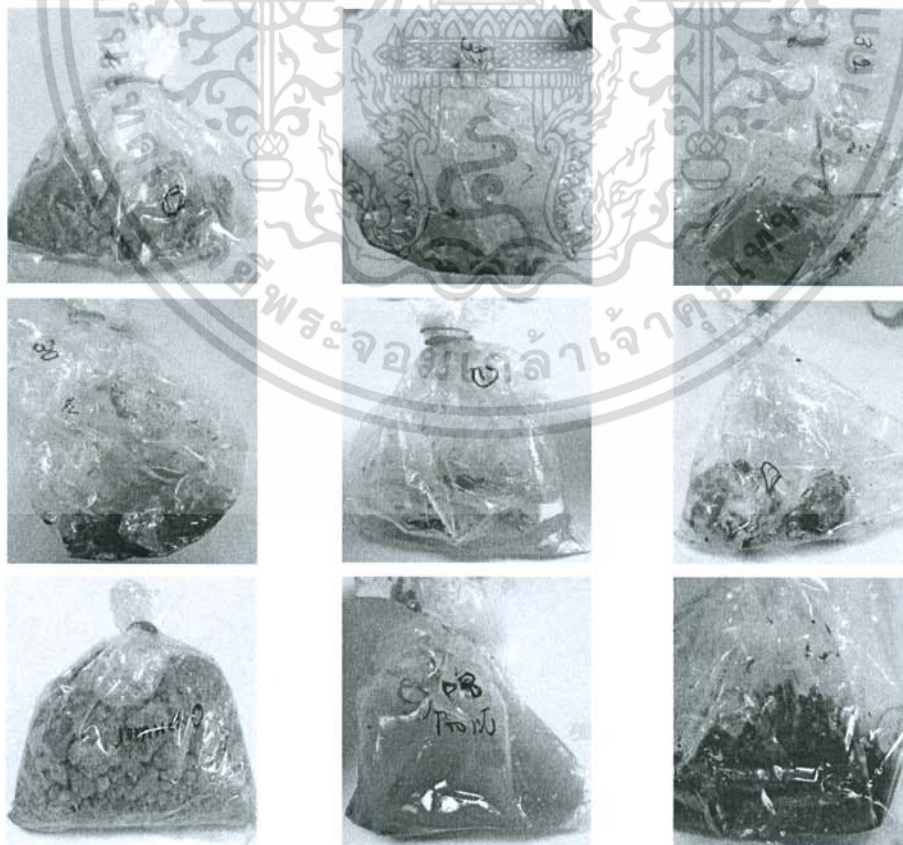
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 แหล่งตัวอย่างที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์

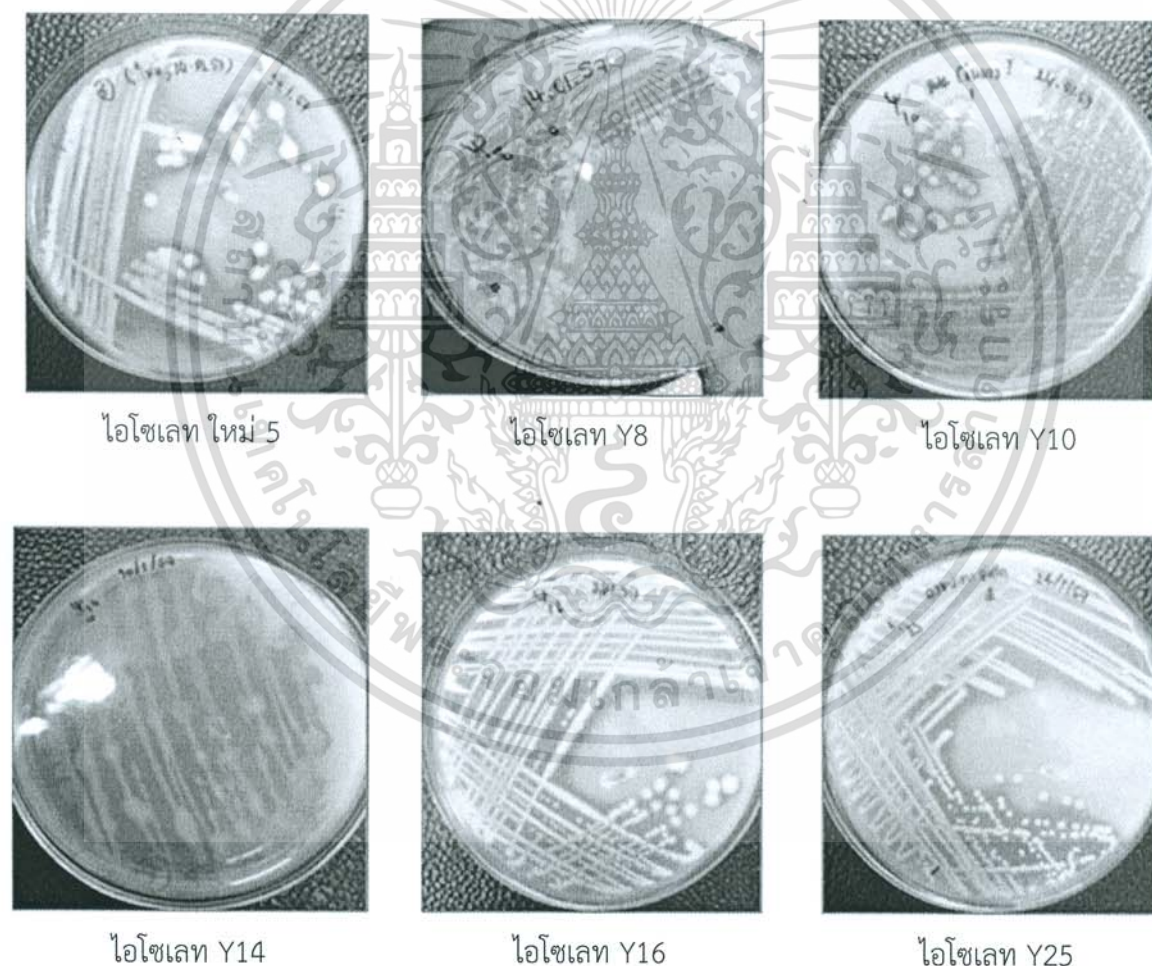
ตัวอย่างที่นำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์เก็บได้จากแหล่งดินและน้ำเสียจากบริเวณชุมชน ร้านอาหาร บริเวณอาคารบ้านเรือนต่างๆ และโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานอุตสาหกรรมน้ำมัน เป็นต้น โดยเลือกบริเวณที่มีคราบไขมันสะสมอยู่ เนื่องจากไขมันมีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบย่อย เมื่อมีการชะล้างคราบไขมันที่มาจากกิจกรรมต่างๆ ทำให้เกิดการทับถมในบริเวณดังกล่าวเป็นเวลานาน ซึ่งอาจมีการสะสมของจุลินทรีย์และอาจพบผลพลอยได้ที่เกิดจากหมักกลีเซอรอลโดยจุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเฉพาะการผลิต 3-hydroxypropionic acid ดังนั้นจึงได้เลือกเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินและน้ำเสียเหล่านี้เพื่อนำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic acid โดยลักษณะตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 4.1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ **ภาพที่ 4.1** ตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในผลิตกรด

เมื่อนำตัวอย่างดินและน้ำเสียจำนวนทั้งหมด 198 ตัวอย่าง มาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread plate technique ลงบนอาหารแข็งที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร (Tabuchi และคณะ, 1981) ลงในอาหารแข็งเพื่อใช้สังเกตจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด หากจุลินทรีย์ชนิดใดสามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างกรดออกมาจะพบการเจริญของโคโลนีที่มีโซนใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสแสดงไว้ดังภาพที่ 4.2 จากการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสได้เมื่อเจริญในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไม่มีอากาศ แสดงไว้ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีและการเกิดโซนใสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
บริเวณหลังร้านบะหมี่หมูแดงโรงอาหารเก่า คณะวิทยาศาสตร์ (สจล.)	เก่า (8.1.57)	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	เก่า 2	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	เก่า 5	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำค้างท่อบริเวณหน้าห้องเช่าสยาม1 ซอย อุดมสุข 42 แยก 10-4 เขตบางนา กรุงเทพฯ	ใหม่ ก	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	ใหม่ จ	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียจากบริษัท ลพบุรีสตาร์ จำกัด	ใหม่ (6.1.57)	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี	ใหม่ (8.1.57)	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
บริเวณร้านข้าวไข่เจียวและลูกชิ้นทอด โรงอาหารเก่าคณะวิทยาศาสตร์ (สจล.)	ใหม่ 3	สีใส กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	ใหม่ 4	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	ใหม่ 5	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
น้ำเสียจากบริษัท ทรัพย์ทิพย์ จำกัด อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี	ใหม่ 8	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	ใหม่ 10	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
	ใหม่ 12	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเน่าเสียข้างหอใน (สจล.)	Y8	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียจากร้านน้ำเต้าหู้	Y10	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	Y14	สีเทา กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
ท่อน้ำเสียปล่อยทิ้งจากบ้านเรือนบริเวณ	Y16	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
ข้างร้านค้าลุงใหญ่ใจดี ซอยอุดมสุข 42	Y21	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
แยก 2 เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y24	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียบริเวณร้านอาหารริมราง ซอยเก๊ก (สจล.)	Y25	สีขาว กลมเล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรัตน์ ซอยเก๊ก1 (สจล.)	Y26	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y27	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y28	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y29	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y31	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	Y32	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	Y33	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
น้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรรัตน์ ซอยเก็ก1 (สจล.)	Y34	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำค่างทอที่มีเศษผลไม้และใบไม้เน่าบริเวณ ซอยอุดมสุข 42 แยก 10-4	Y35	สีใส กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y36	สีเหลือง กลม ผิวมันวาว
	Y37	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y38	สีใส กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y39	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
เศษใบไม้เน่าทับถมบริเวณท่อน้ำ	Y43	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
บ้านเรือนในชุมชนเซลิ้ง 1 เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y44	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
ลูกยอเน่าบริเวณต้นยอซอยอุดมสุข42 แยก10-4 เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y46	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	ใหม่ 2	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว

ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
ตะกอนดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้งหอพัก ซอย ลาดกระบัง 13/8	B1-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B1-2	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B1-3	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B1-4	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ดินจากบริเวณร้านอาหารตามสั่ง ซอย ลาดกระบัง 13/8	B2-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B2-2	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
น้ำจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรรัตน์ เก็ก 1 (สจล.)	P1-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	P1-2	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ท่อน้ำเสียปล่อยทิ้งจากบ้านเรือนบริเวณข้าง ร้านค้าลุงใหญ่ใจดี ซอยอุดมสุข 42 แยก 2 เขตบางนา กรุงเทพมหานคร	P3-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
ตะกอนดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้ง บ้านพักนาย ธนา พรหมใจรักษ์ 633 ซอยจรัญสนิทวงศ์ 75 แยก 12 เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร	T3	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ดินจากบริเวณลำไก่อ บ้านพักนาย ธนา พรหมใจรักษ์ 633 ซอยจรัญสนิทวงศ์ 75 แยก 12 เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร	T4	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ตะกอนดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้งร้านขาย อาหารซอยพหลโยธิน 46 เขตจตุจักร แขวงเสนานิคม กรุงเทพมหานคร	T5	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งดินและน้ำเสียที่เก็บจากบริเวณที่คาดว่าจะมีการสะสมของไขมันและกลีเซอรอล จำนวน 198 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและมีการผลิตกรด (สร้างโซนใส) ได้ 37 และ 12 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ (ตารางที่ 4.1) และไม่มีอากาศ (ตารางที่ 4.2) ตามลำดับ โดยสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างโซนใสได้จำนวนมากกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ และตัวอย่างน้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรรัตน์ ซอยเก็ก1 (สจล.) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างโซนใสได้จำนวนมากที่สุด โดยคัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท (8 ไอโซเลท เจริญในสภาวะที่มีอากาศ และ 2 ไอโซเลท เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากบริเวณถังขยะจะมีการทิ้งสิ่งสกปรกทุกประเภท ซึ่งรวมถึงสิ่งสกปรกที่มีไขมันและกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ เช่น ถูกลูกชิ้นทอด ถูใส่ปาต่องโก๋ ถูใส่หมูหรือไก่สด หรือเศษอาหารประเภทผัก ทอดที่รับประทานไม่หมด และมีการทิ้งสะสมกันทุกวันเป็นเวลานาน ดังนั้นจึงอาจมีการสะสมของจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากและสามารถพบจุลินทรีย์ที่หมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตเป็นกรดต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในสภาวะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่มีอากาศมีลักษณะของโคโลนีที่เหมือนกันมาก โดยลักษณะของโคโลนีมีสีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการคัดแยกจุลินทรีย์ผู้ทดลองใช้อาหาร MRS ดัดแปลง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. มักชอบเจริญในอาหารชนิดนี้ ดังนั้นโอกาสที่จะคัดแยกได้แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จึงมีสูงมาก และจากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าในปัจจุบันมีเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่สามารถหมักกลีเซอรอลไปเป็น 3-hydroxypropionic acid ได้ ดังนั้นในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศครั้งนี้จึงเลือกใช้อาหาร MRS ดัดแปลงและพบว่าแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้มีลักษณะเหมือนกันมาก ซึ่งต่างจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่มีลักษณะกลม สีขาว มีขนาดเล็กและใหญ่แตกต่างกันออกไป มีผิวหน้าที่มันวาว แต่บางโคโลนีมีลักษณะสีใส ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 3, Y35 และ Y38 และบางโคโลนีมีสีเหลือง ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 10, Y10, Y36 และ Y39 จากนั้นจึงได้นำจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสทั้งหมด ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อนำไปตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

4.3 การตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth และจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ดัดแปลง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Arasu และคณะ, 2011) เพื่อแยกตะกอนเซลล์ จากนั้นกรองส่วนใสอีกครั้งด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และนำส่วนใสที่ได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC โดยปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ แสดงดังตารางที่ 4.3 และ 4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไม่มีอากาศ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
1	เก่า (8.1.57)	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.3
2	เก่า 2	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2
3	เก่า 5	2.3 ± 0.3	1.4 ± 0.6
4	ใหม่ ก	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
5	ใหม่ จ	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
6	ใหม่ (6.1.57)	1.2 ± 0.7	1.5 ± 0.3
7	ใหม่ (8.1.57)	1.1 ± 0.6	1.9 ± 0.5
8	ใหม่ 3	2.2 ± 0.4	1.5 ± 0.5
9	ใหม่ 4	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
10	ใหม่ 5	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.4
11	ใหม่ 8	0.0 ± 0.1	2.2 ± 0.2
12	ใหม่ 10	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
13	ใหม่ 12	1.8 ± 0.5	0.0 ± 0.2
14	Y8	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.1
15	Y10	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.7
16	Y14	1.7 ± 0.6	1.6 ± 0.4
17	Y16	1.5 ± 0.7	1.8 ± 0.4
18	Y21	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
19	Y24	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2
20	Y25	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.5
21	Y26	2.9 ± 0.5	3.4 ± 0.4
22	Y27	1.9 ± 0.7	2.2 ± 0.5
23	Y28	1.6 ± 0.6	1.7 ± 0.8
24	Y29	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.5
25	Y31	1.6 ± 0.4	2.2 ± 0.7
26	Y32	1.6 ± 0.6	0.8 ± 0.2
27	Y33	1.8 ± 0.3	3.0 ± 0.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
28	Y34	0.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
29	Y35	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
30	Y36	0.0 ± 0.1	0.8 ± 0.3
31	Y37	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
32	Y38	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
33	Y39	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
34	Y43	0.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2
35	Y44	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1
36	Y46	0.0 ± 0.1	0.6 ± 0.2
37	ใหม่ 2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
1	B1-1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
2	B1-2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2
3	B1-3	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
4	B1-4	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
5	B2-1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
6	B2-2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
7	P1-1	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.1
8	P1-2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
9	P3-1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
10	T3	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.4
11	T4	2.1 ± 0.3	2.0 ± 0.2
12	T5	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีการสร้างโซนใส (clear zone) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid จำนวน 28 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า มีเพียง 5 ไอโซเลทที่ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้เมื่อเจริญในสภาวะเขย่าเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 8, Y34, Y36, Y43 และ Y46 และมีเพียง 2 ไอโซเลทที่ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้เมื่อเจริญในสภาวะนิ่งเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 12 และ Y8 อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ประเภท wide type สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุด 2.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวคือ *Lactobacillus collinoides* 17 (Garai-Ibabe และคณะ, 2008) และจากการศึกษาครั้งนี้พบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้อย่างน้อย 2.8 กรัมต่อลิตร เพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลท Y26 และ Y33 โดยไอโซเลท Y26 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเสียจากถังขยะบริเวณร้านบะหมี่หมูแดง เกกกี 1 (สจล.) สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่า 2.8 กรัมต่อลิตร ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้สูงสุด 3.4 ± 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า นอกจากนี้ไอโซเลท Y26 ยังสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่าที่มีรายงานในปัจจุบัน (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท Y26 เพื่อนำไปทำการศึกษาต่อไป

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีการสร้างโซนใส (clear zone) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท พบเพียง 3 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้แก่ 1. ไอโซเลท P1-1 ผลิตได้ 0.2 ± 0.1 กรัมต่อลิตรในสภาวะนิ่ง แต่ไม่มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ในสภาวะเขย่า 2. ไอโซเลท T3 ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ 2.5 ± 0.2 และ 2.4 ± 0.4 กรัมต่อลิตร ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ตามลำดับ และ 3. ไอโซเลท T4 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ 2.1 ± 0.3 และ 2.0 ± 0.2 กรัมต่อลิตร ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ตามลำดับ จากผลที่ได้พบว่าไอโซเลท T3 มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศทั้งในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า แต่เนื่องจากปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ไอโซเลท T3 ผลิตได้นั้นยังต่ำกว่า 2.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าเป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้ที่ได้ตั้งไว้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้และมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศจึงไม่ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทำการศึกษาต่อไป

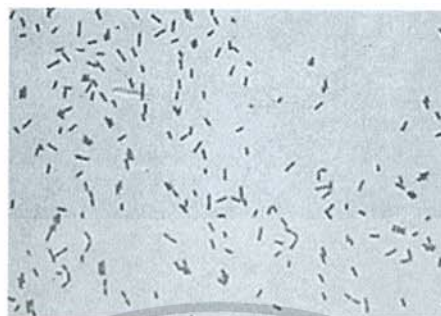
ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	Carbon source	Aeration condition	Condition	Productivity (g/L)	Reference
<i>Lactobacillus reuteri</i>	glycerol	CO ₂ fixation 5% CO ₂ and avoid aeration	static	0.3 g/L	Garai-Ibabe และคณะ (2008)
<i>K. pneumonia</i>	glycerol	aerobic conditions	shaking	2.0 g/L	Luo และคณะ (2012)
<i>Lactobacillus</i> sp.	glycerol	CO ₂ fixation 5% CO ₂ and avoid aeration	static	0.1 g/L	Luo และคณะ (2011)
<i>L. collinoides</i> 17	glycerol	CO ₂ fixation 5% CO ₂ and avoid aeration	static	2.8 g/L	Garai-Ibabe และคณะ (2008)
<i>Byssochlamys</i> sp.	acrylic acid	-	-	4.8% v/v	Takamizawa และคณะ (1993)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Propionate	CO ₂ fixation and acetate assimilation	prototroph autotroph	1.3×10^{-4} g/L	Holo (1989)

4.4 การศึกษาลักษณะพื้นฐานทั่วไปของไอโซเลท Y26

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของไอโซเลท Y26 โดยตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ได้แก่ สี รูปร่าง ความหนา และขอบของโคโลนี นอกจากนี้ยังตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เชิงสัณฐานเป็นเชิงสัณฐานที่ส่งวันเวสสำหรับงานเพื่อการศึกษานี้ เมื่อผู้ดูแลเห็นใบเซอร์ไฮเซนตามการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยการย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่าง การจัดเรียงตัว การสร้างสปอร์ และวัดขนาดของจุลินทรีย์ แสดงผลดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลท Y26 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลท Y26 พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว กลมเล็ก ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันวาว มีเมือกเหนียว การย้อมแกรมติดสีแดงของ Safanin จึงจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และมีการจัดเรียงตัวอยู่กันเป็นคู่ ขนาดเซลล์เท่ากับ 1.5 ไมครอน และไม่มีการสร้างสปอร์

4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลท Y26

จำแนกสายพันธุ์ของไอโซเลท Y26 ได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ 16S rRNA gene ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดย 16 rRNA จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้ 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT) เป็น primers สำหรับโคลนยีน 16S rRNA โดยจะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM T-easy และ Transform เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α จากนั้นสกัดพลาสมิด ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ผลดังภาพที่ 4.4 และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

1 AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG ATTGAACGCT GCGGCGAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC
61 GGTAGCACAG AGAGCTTGCT CTCGGGTGAC GAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ATGTCTGGGA
121 AACTGCCTGA TGGAGGGGGA TAACTACTGG AAACGGTAGC TAATACCGCA TAATGTCGCA
181 AGACCAAAGT GGGGGACCTT CGGGCCTCAT GCCATCAGAT GTGCCCAGAT GGGATTAGCT
241 AGTAGGTGGG GTAACGGCTC ACCTAGGCGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG AGGATGACCA
301 GCCACACTGG AACTGAGACA CCGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAAATATTG
361 CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT
421 AAAGCACTTT CAGCGGGGAG GAAGGCGGTG AGGTTAATAA CCTCATCGAT TGACGTTACC
481 CGCAGAGGAA GCACCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGTGCAAGC
541 GTTAATCGGA ATTAAGTGGG GTAAAGCGCA CGCAGGCGGT CTGTCAAGTC GGATGTGAAA
601 TCCCCGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTTC AACTGGCAG GCTAGAGTCT TGTAAGAGGGG
661 GGTAAGATTC CAGGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATCT GGAGGAATAC CGGTGGCGAA
721 GCGGGCCCCC TGGACAAAGA CTGACGCTCA GGTGCGAAAG CGTGGGGGAG AAACAGGATT
781 AGATAACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGTGATTTG GAGGTTGTGC CCTTGAGGCG
841 TGGCTTCCGG AGCTAACGCG TTAAATCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTTAAAA
901 CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTTAA TTCGATGCAA
961 CCGAAGAAGC CTTACCTGGT CTTGACATCC ACAGAACTTT CCAGAGATGG ATTGGTGCCT
1021 TCGGGAAGT TGAGACAGGT GCTGCATGGC TGTGCTCAGC TCGTGTGTGT AAATGTTGGG
1081 TTAAGTCCC GCAACGAGCG AACCCCTTAT CTTTGTGTC AGCGGTTAGG CCGGGAAGT
1141 AAAGGAGACT GCCAGTGATA AACTGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAGT CATCATGGCC
1201 CTTACGACCA GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGCATATAC AAAGAGAAGC GACCTCGCGA
1261 GAGCAAGCGG ACCTCATAAA GTATGTOGTA GTCGGGATTG GAGTCTGCAA CTCGACTCCA
1321 TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGTAGATC AGAATGCTAC GGTGAATACG TTCGCGGGCC
1381 TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TGGGTTGCAA AAGAAGTAGG TAGCTTAACC
1441 TTCGGGAGGG CGCTTACCAC TTTGTGATTC ATGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAAC
1501 C

```

ภาพที่ 4.4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene ของไอโซเลท Y26

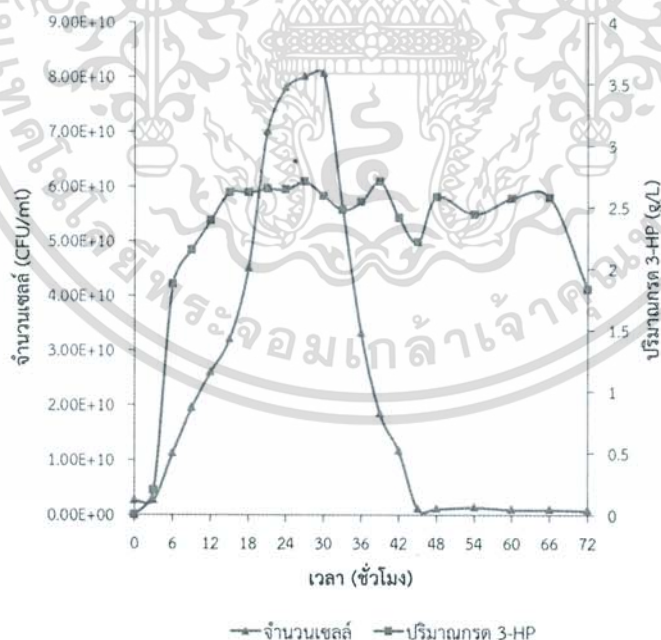
โดย *K. pneumoniae* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนและมีแคปซูล ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งแบบใช้และไม่ใช้อากาศ (Facultative anaerobic bacterium) จัดอยู่ใน family *Enterobacteriaceae* พบได้ทั่วไปในดิน และเป็น normal flora ที่อาศัยอยู่ในปาก ผิวหนัง และลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีทั้งสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคและไม่ก่อโรค (Arasu และคณะ, 2011) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้ได้ถูกจัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Biosafety Level 2, BSL2) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้หากใช้การปฏิบัติตาม BSL 1 ร่วมกับการควบคุมการเข้าออกห้องปฏิบัติการ โดยบุคลากรต้องใช้อุปกรณ์ความปลอดภัย เช่น ตู้ปลอดเชื้อ Class II (อากาศก่อนเข้าตู้จะกรองผ่าน HEPA filter แล้วลงสู่พื้นที่ปฏิบัติงานก่อนปล่อยออกนอกตู้) และหม้อนิ่งฆ่าเชื้อ เป็นต้น (คันสนีย์ ชีระพันธ์, 2555) นอกจากนี้จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *K. pneumoniae* หลายสายพันธุ์ซึ่งรวมทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิต 3-hydroxypropionic acid และสาร 1,3 propanediol ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพอลิเมอร์ และอื่นๆ เป็นต้น (Biebl และคณะ, 1999 ; Zeng และ Biebl, 2002) ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าจะสามารถที่จะทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *K. pneumoniae* ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า *K. pneumoniae* สามารถผลิตวิตามิน B12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และถูกใช้เป็นโคเอนไซม์สำหรับ glycerol dehydratase (dhaB) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 3-hydroxypropionic acid โดยผ่านวิธีต่าง ๆ (Kumar และคณะ, 2013) ซึ่งหากใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตวิตามิน B12 ได้เอง จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้คือ *K. pneumonia* Y26 ไปทำการศึกษาต่อไป

4.6 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิต 3-hydroxypropionic acid ของ *Klebsiella pneumonia* Y26

ศึกษาการเจริญเติบโตของ *K. pneumonia* Y26 โดยใช้ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ OD_{600nm} เท่ากับ 0.8 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง โดยใช้วิธี Spread plate technique เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและรายงานผลในหน่วย CFU/ml และตรวจสอบปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตในเวลาต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC แสดงผลดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตและปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรด 3-HP) ของ *Klebsiella pneumonia* Y26 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth ที่เติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาควิชาชีววิทยาเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญตเห็นาเบไซบะระยษนต่านการค้ำไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.5 พบว่าการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* Y26 ระยะ lag phase อยู่ในช่วง 0 - 3 ชั่วโมง log phase อยู่ในช่วง 3 - 24 ชั่วโมง มีระยะ stationary phase ที่ค่อนข้างสั้น และเข้าสู่ระยะ death phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 สำหรับการตรวจวัดปริมาณ 3-hydroxypropionic acid พบว่าการผลิต 3-hydroxypropionic acid พร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุดในช่วง stationary phase เท่ากับ 2.7 ± 0.3 กรัมต่อลิตร และแนวโน้มของปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ค่อนข้างคงที่ภายหลังจากการเจริญในช่วง stationary phase ผ่านไปแล้ว ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ช่วง death phase แล้ว จึงไม่มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ออกมาเพิ่มเติมนั่นเอง นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 66 เป็นต้นไปปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid มีแนวโน้มลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ช่วง death phase แล้วอาจมีการแตกของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้มีเอนไซม์หรือสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่อาจสามารถเปลี่ยน 3-hydroxypropionic acid ไปเป็นสารชนิดอื่นจึงทำให้ปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ตรวจพบมีค่าลดน้อยลง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกทำการเพาะเลี้ยง *K. pneumonia* Y26 ที่เวลาเพียง 60 ชั่วโมงเท่านั้น

4.7 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid

หาก *Klebsiella pneumonia* Y26 สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูง ๆ ย่อมเป็นข้อได้เปรียบของแบคทีเรีย เนื่องจากไม่จำเป็นต้องควบคุมหรือต้องเติมกลีเซอรอลลงไปในอาหารในระหว่างที่ทำการหมัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยเพาะเลี้ยง *K. pneumonia* Y26 ที่ควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากันที่ค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 ใน M9 broth ที่มีกลีเซอรอล 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่ง และ สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงไปตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้แสดงดังในตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร) โดย *Klebsiella pneumonia* Y26 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของกลีเซอรอลแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของ กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
20	2.5 ± 0.6	3.1 ± 0.4
40	3.2 ± 0.9	4.8 ± 0.7
60	4.1 ± 1.0	6.2 ± 0.6
80	4.5 ± 0.7	7.9 ± 1.0
100	3.8 ± 0.8	5.3 ± 0.7

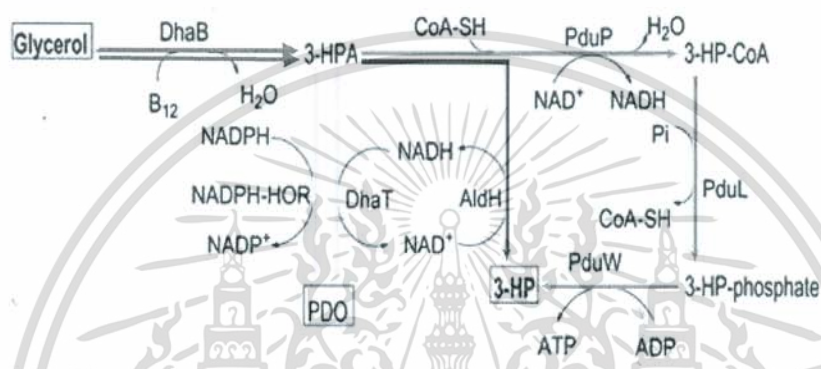
DhaB

จากตารางที่ 4.6 พบว่า *K. pneumonia* Y26 มีแนวโน้มในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงขึ้นเมื่อใช้กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุด เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ทั้งที่เจริญในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้ 4.5 ± 0.7 และ 7.9 ± 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งคิดเป็นร้อยละ 176 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Huang และคณะ (2013) ที่รายงานว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *K. pneumonia*/pUC18kan-aldHec ในสภาวะที่มีอากาศจะทำให้การผลิต 3-hydroxypropionic acid สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และการเพิ่มอัตราการให้อากาศมีผลทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีขึ้นและมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติมักใช้วิถี CoA-dependent (ดังภาพ 4.6; Glycerol

→ 3-hydroxypropionic acid) ซึ่งอาศัยการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เรียกว่า propanediol utilization (*pdu*) โดยเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในการย่อยสลายกลีเซอรอลเริ่มจากกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) ด้วยเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB*) ที่มีวิตามิน B12 เป็นโคเอนไซม์ หลังจากนั้น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 3-HP-phosphate และ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเอนไซม์ เช่น propanoldehydrogenase CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase (*PduP*) phosphotransacylase (*PduL*) และ propionate kinase (*PduW*) (Leal และคณะ, 2003; Liu และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 2007; Xue และคณะ, 2008) จากภาพ 4.6 จะพบว่าวิถี CoA-dependent (เส้นสีฟ้า) มีเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีอยู่ 2 ชนิดคือ coenzyme A (CoA)-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP) และ propionate kinase (PduW) ซึ่งต้องการ NAD^+ และ ADP เป็นโคเอนไซม์ ตามลำดับ โดยทั้ง NAD^+ และ ADP จะถูก regenerated ได้ปริมาณสูงเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะ oxidative metabolism หรืออยู่ในสภาวะเขย่าซึ่งมีออกซิเจนสูงนั่นเอง โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆในวิถี CoA-dependent (เส้นสีฟ้า) แสดงดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.6 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionic acid

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kumar และคณะ, 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งดินและน้ำเสียที่เก็บจากบริเวณที่คาดว่ามีการสะสมของไขมัน และกลีเซอรอล จำนวน 198 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและมีการผลิตกรด (สร้างโซนใส) ได้ 37 และ 12 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ตามลำดับ

ตัวอย่างน้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรรัตน์ ซอยเก๊ก1 (สจล.) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างโซนใสได้จำนวนมากที่สุด โดยคัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท (8 ไอโซเลท เจริญในสภาวะที่มีอากาศ และ 2 ไอโซเลท เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ)

จากการตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้น้อย 2.8 กรัมต่อลิตร เพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลท Y26 และ Y33 ในขณะที่ไม่พบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้น้อย 2.8 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ไอโซเลท Y26 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเสียจากถังขยะบริเวณร้านบะหมี่หมูแดง เก๊ก1 (สจล.) สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่า 2.8 กรัมต่อลิตร ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้สูงสุด 3.4 ± 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า นอกจากนี้ไอโซเลท Y26 ยังสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่าที่มีรายงานในปัจจุบัน ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท Y26 เพื่อนำไปทำการศึกษาคืบต่อไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของไอโซเลท Y26 พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว มีเมือกเหนียว การย้อมแกรมติดสีแดงของ Safanin จึงจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และมีการจัดเรียงตัวอยู่กันเป็นคู่ ขนาดเซลล์เท่ากับ 1.5 ไมครอน และไม่มีการสร้างสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าไอโซเลท Y26 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumonia* ร้อยละ 99 ดังนั้นจึงเรียกไอโซเลท Y26 ว่า *Klebsiella pneumonia* Y26

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิต 3-hydroxypropionic acid ของ *K. pneumonia* Y26 เมื่อใช้ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ OD_{600nm} เท่ากับ 0.8 และทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า *K. pneumonia* Y26 มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid พร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุดในช่วง stationary phase เท่ากับ 2.7 ± 0.3 กรัมต่อลิตร และแนวโน้มของปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ค่อนข้างคงที่ภายหลังจากการเจริญในช่วง stationary phase ผ่านไปแล้ว

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid พบว่า *K. pneumonia* Y26 มีแนวโน้มในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงขึ้นเมื่อใช้กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุด เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ทั้งที่เจริญในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้ 4.5 ± 0.7 และ 7.9 ± 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งคิดเป็นร้อยละ 176

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาปริมาณที่เหลืออยู่ของกลีเซอรอลหลังจากการหมัก เพื่อหาค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid เช่น ปริมาณเซลล์เริ่มต้น ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน และพีเอช เป็นต้น

ควรศึกษาการเพาะเลี้ยงในถังหมักเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงใน shake-flask

บทที่ 6

สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด

- นำเสนอผลงานโดยโปสเตอร์ระดับนานาชาติ ในงานประชุม “The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology” ภายใต้หัวข้อ “Isolation and Screening of Microorganisms with Potential for Bioconversion of Glycerol to 3-Hydroxypropionic Acid” ระหว่างวันที่ 11-13 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรม Novotel Chumphon Beach Resort and Golf ชุมพร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จารุณี เกสรพิกุล และสุรวัดน์ ชลอสันตสุข. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาสำหรับนักศึกษาวิทยาศาสตร์ การเกษตร (700201). 2554;คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขต สารสนเทศเพชรบุรี, เพชรบุรี.

คັນสนีย์ ซีระพันธ์. ความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. วารสารกรม วิทยาศาสตร์บริการ 2555;60:15-18

Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 2006;314:1565-1568.

Andersen G, Björnberg O, Polakova S, Pynyaha Y, Rasmussen A, Møller K, Hofer A, Moritz T, Sandrin MPB, Merico AM, Compagno C, Åkerlund HE, Gojkovic Z, Piškur J. A second pathway to degrade pyrimidine nucleic acid precursors in eukaryotes. *J Mol Biol* 2008;380:656-666.

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

Ashok S, Raj SM, Ko Y, Sankaranarayanan M, Zhou S, Kumar V, Park S. Effect of nitrate on glycerol metabolism and anaerobic production of 3-hydroxypropionic acid by recombinant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing *puuC*. *Metab Eng* 2013;15:10-24.

Behr A, Botulinski A, Carduck F-j, Schneider M. Process for preparing 3-hydroxypropionic acid. 1996;Patent application no. EP0579617.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Booth IR, Cash P, O'Byrne C. Sensing and adapting to acid stress. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 2002;81:33-42.

Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Kim WY, Kim YB, Park YH. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001;80:193-199.

Dunlop MJ. Engineering microbes for tolerance to next generation biofuel. *Biotechnol Biofuels* 2011;4:32.

Fuchs G. Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* 2011;65:631-658.

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

Haas T, Brossmer C, Meier M, Arntz D, Freund A. Process for preparing 3-hydroxypropionic acid or its salt. 2000;Patent application no. EP0819670.

Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate. *Biotechnol Bioeng* 2010;106:462-473.

Holo H. *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. *Arch Microbiol* 1989;151:252-256.

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

Hügler M, Huber H, Stetter KO, Fuchs G. Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch Microbiol* 2003;179:160-173.

Jarboe LR, Liu P, Royce LA. Engineering inhibitor tolerance for the production of biorenewable fuels and chemicals. *Curr Opin Chem Eng* 2011;1:38-42.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Johnson DT, Taconi KA. 2007. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 2007;26:338-348.

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

Kumar V, Mugesh S, Jae K, Durgapal M, Ashok S, Ko Y, Sarkar R, Park S. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol using resting cells of *Klebsiella pneumoniae* J2B strain with overexpression of KGSADH. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96:373-83.

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Mavrovouniotis ML. Duality theory for thermodynamic bottlenecks in bioreaction pathways. *Chem Eng Sci* 1996;51:1495-507.

Meng XS, Abraham T, Tsobanakis P. Process for preparing 3- hydroxycarboxylic acids. 2007;Patent application no. 20070015936.

Pina CD, Falletta E, Rossi M. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. *Green Chem* 2011;13:1624-32.

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

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

Rathnasingh C, Raj SM, Lee Y, Catherine C, Ashok S, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol* 2012;157(4):633-640.

Roe AJ, O'Byrne C, McLaggan D, Booth IR. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 2002;148:2215-2222.

Saini R, Kapoor R, Kumar R, Siddiqi TO, Kumar A. CO₂ utilizing microbes - a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 2011;29:949-960.

Sneath PHA. Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Vol II, 1986;Williams & Wilkins, Baltimore.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Tabuchi T, Sugisawa T, Ishidori T, Nakahara T, Sugiyama J. Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*. *Agric Biol Chem* 1981;45:475-479.

Takamizawa K, Horitsu H, Ichikawa T, Kawai K, Suzuki T. β -hydroxypropionic acid production by *Byssoschlamys* sp. grown on acrylic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993;40:196-200.

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

Valdehuesa KNG, Liu H, Nisola GM, Chung W-J, Lee SH, Park SJ. Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3-hydroxypropionic acid as C3 platform chemical. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:3309–3321

van Maris AJA, Konings WN, Van Dijken JP, Pronk JT. Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metab Eng* 2004;6(4):245-255.

Warnecke T, Gill RT. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microb Cell Fact* 2005;4:425.

Warnecke TE, Lynch MD, Lipscomb ML, Gill RT. Identification of a 21 amino acid peptide conferring 3-hydroxypropionic acid stress-tolerance to *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2012;109(5):1347-1352.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

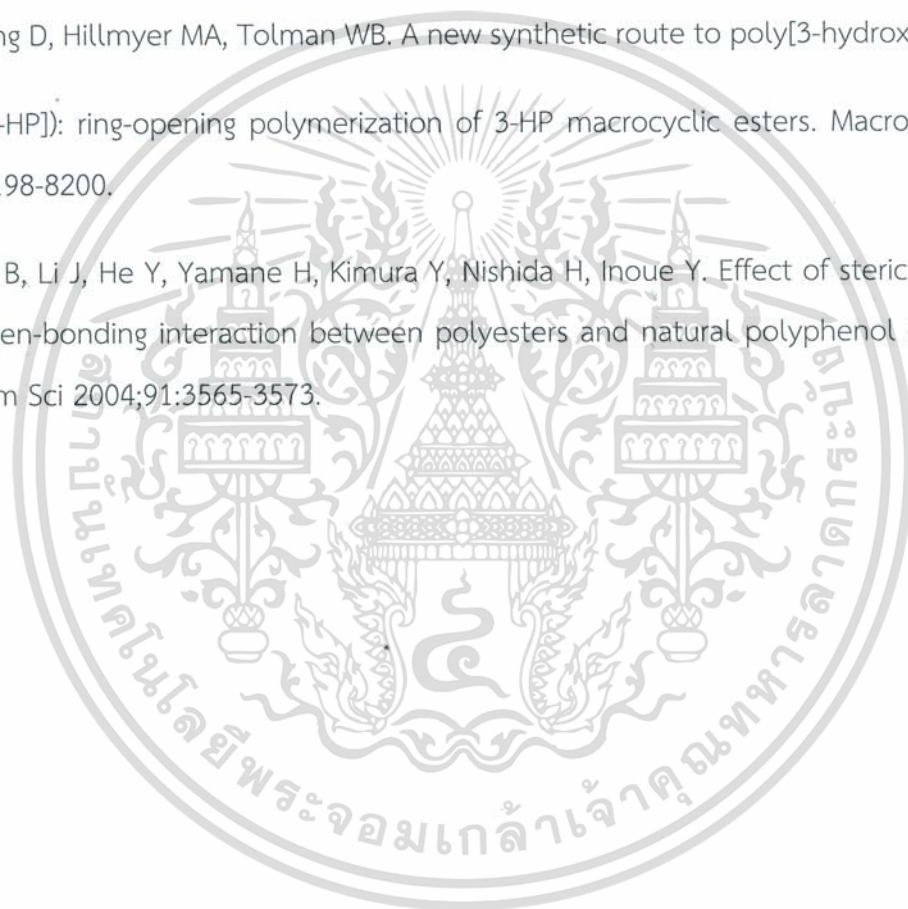
Xue J, Murrieta CM, Rule DC, Miller WK. Exogenous or L-rhamnose-derived 1,2-propanediol is metabolized via a pduD-dependent pathway in *Listeria innocua*. Appl Environ Microbiol 2008;74:7073-7079.

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

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

Zhang D, Hillmyer MA, Tolman WB. A new synthetic route to poly[3-hydroxypropionic acid] (P[3-HP]): ring-opening polymerization of 3-HP macrocyclic esters. Macromolecules 2004;37:8198-8200.

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



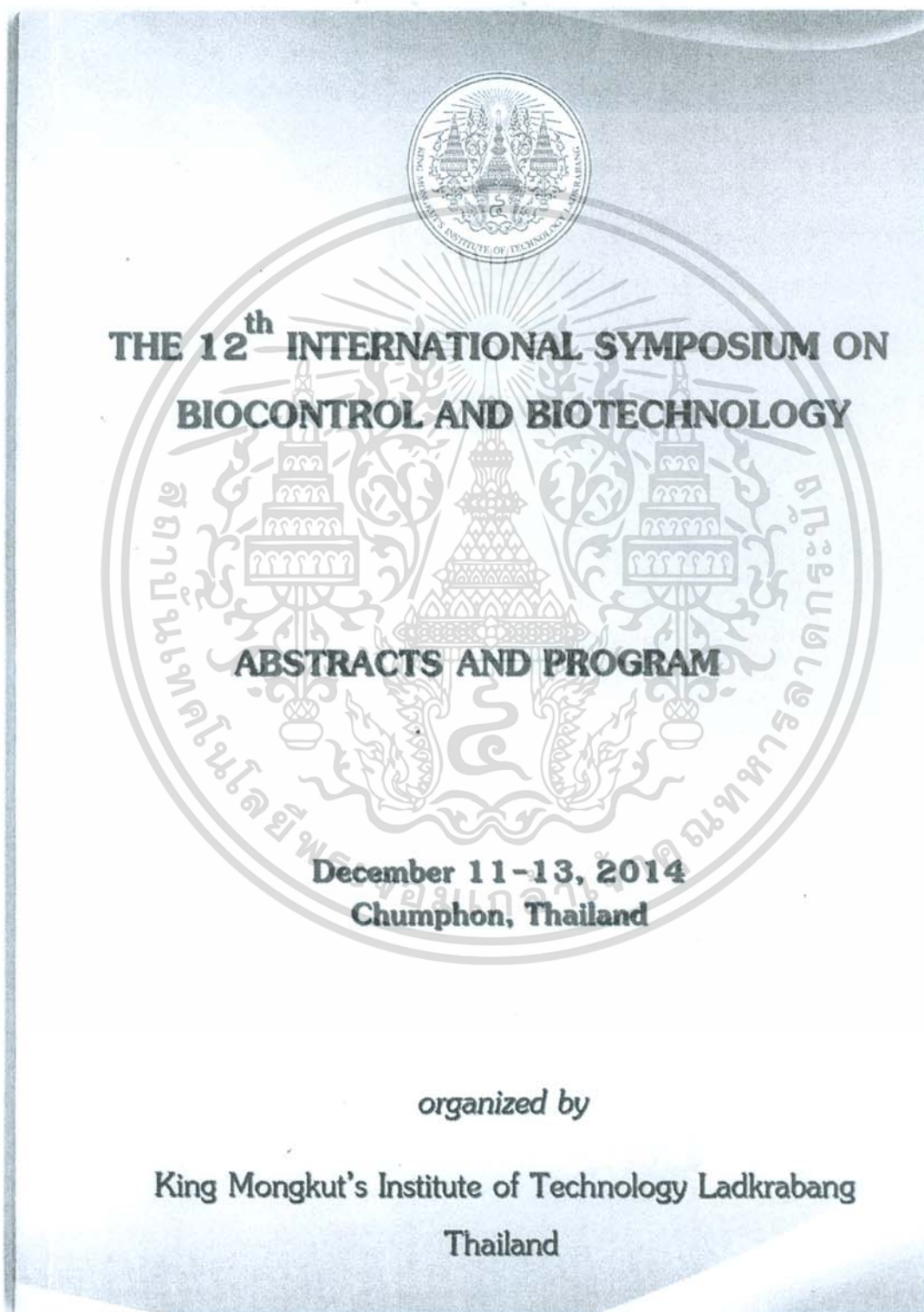
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

หลักฐานเอกสารอ้างอิงสำหรับรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้ทั้งหมด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P-024

Isolation and Screening of Microorganisms with Potential for Bioconversion of Glycerol to 3-Hydroxypropionic Acid

Somphit Sornyotha*, Chakrit Tachaapaikoon, Patthra Pason and Khanok Ratanakhanokchai

Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

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

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

Abstract

3-Hydroxypropionic acid (3-HP) is a value-added chemical, which can be used to produce a wide range of chemical derivatives, and that can be produced from renewable glycerol by microbial bioconversion. For enhancing 3-HP production, this work aimed to isolate and select strains with potential to perform as the cell factory for bioconversion of glycerol to 3-HP. One hundred and ninety eight natural source samples were collected, cultivated and screened for 3-hydroxypropionic acid-producing microorganisms. Only 26 isolated strains were found with the ability to bioconvert the substrate to 3-HP. One of them was selected because it gave the highest 3-HP production, and it was identified as *Klebsiella pneumoniae* by the 16S rRNA gene analysis system, and named Y26. Product optimization conditions were also studied and the best experimental condition for bioconversion of glycerol to 3-HP was established using a rich medium containing 8% (w/v) glycerol as the sole carbon source at 37°C in a rotary shaker at 150 rpm, yielding 7.9 ± 1.0 g 3HP/L.

Keywords: Bioconversion, Glycerol, 3-Hydroxypropionic acid, *Klebsiella pneumoniae*, Screening

*Corresponding author. Email: kssomphi@kmitl.ac.th, chakrit.tac@kmutt.ac.th pathra.pas@kmutt.ac.th, khanok.rat@kmutt.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and Screening of Microorganisms with Potential for Bioconversion of Glycerol to 3-Hydroxypropionic Acid



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

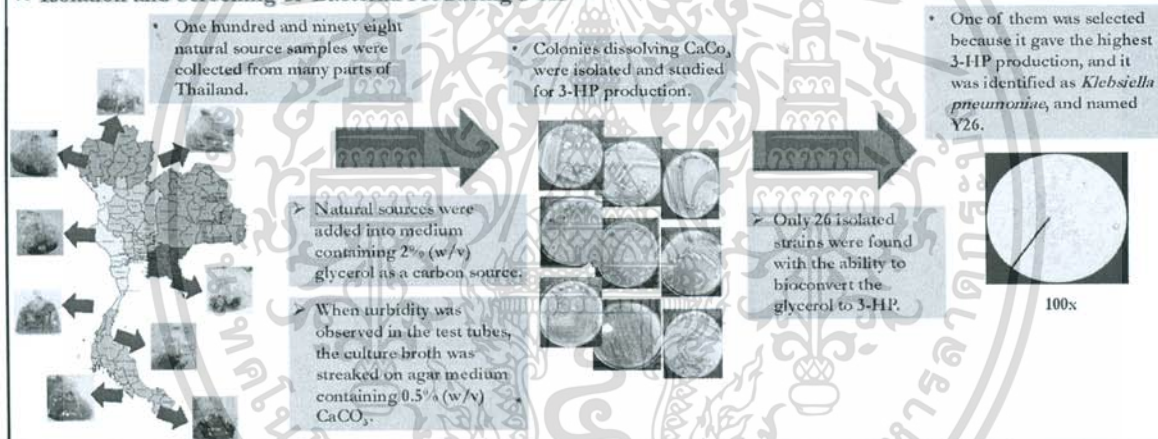
[§] Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

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

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

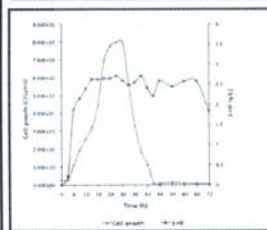
3-Hydroxypropionic acid (3-HP) is a value-added chemical, which can be used to produce a wide range of chemical derivatives, and that can be produced from renewable glycerol by microbial bioconversion. For enhancing 3-HP production, this work aimed to isolate and select strains with potential to perform as the cell factory for bioconversion of glycerol to 3-HP. One hundred and ninety eight natural source samples were collected, cultivated and screened for 3-hydroxypropionic acid-producing microorganisms. Only 26 isolated strains were found with the ability to bioconvert the substrate to 3-HP. One of them was selected because it gave the highest 3-HP production, and it was identified as *Klebsiella pneumoniae* by the 16S rRNA gene analysis system, and named Y26. Product optimization conditions were also studied and the best experimental condition for bioconversion of glycerol to 3-HP was established using a rich medium containing 8% (w/v) glycerol as the sole carbon source at 37 °C in a rotary shaker at 150 rpm, yielding 7.9 ± 1.0 g 3HP/L.

★ Isolation and Screening of Bacterial Producing 3-HP ★



★ Optimization of 3-HP Production by Strain Y26 ★

• Profiles of cell and 3-HP concentrations of a strain Y26.



• Bioconversion of glycerol to 3-HP by a strain Y26 at 37°C.

Culture condition	3-HP (g/L)				
	2% (w/v) Glycerol	4% (w/v) Glycerol	6% (w/v) Glycerol	8% (w/v) Glycerol	10% (w/v) Glycerol
Shake-flask	3.1 ± 0.4	4.8 ± 0.7	6.2 ± 0.6	7.9 ± 1.0	5.3 ± 0.7
Static	2.5 ± 0.6	3.2 ± 0.9	4.1 ± 1.0	4.5 ± 0.7	3.8 ± 0.8

❖ The best condition for bioconversion of glycerol to 3-HP was established using a rich medium containing 8% (w/v) glycerol as the sole carbon source at 37 °C in a rotary shaker at 150 rpm, yielding 7.9 ± 1.0 g 3HP/L.

★ Acknowledgements ★

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายละเอียดงบประมาณที่ใช้จ่ายระหว่างการดำเนินงานโครงการวิจัย

1. ค่าใช้สอย

1.1 ค่าจ้างเหมาวิเคราะห์	5,000 บาท
1.2 ค่าจ้างพิมพ์รายงาน	2,500 บาท
1.3 ค่าจัดทำรูปเล่มรายงาน	2,500 บาท
1.4 ค่าจ้างเหมาบริการ	3,000 บาท

2. ค่าวัสดุ

2.1 ค่าถ่ายเอกสาร	2,000 บาท
2.2 ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์ เช่น ขวด vial จุกยางปิดขวด ฝากลูมิเนียม ที่ cap ฝาขวด เป็นต้น	11,000 บาท
2.3 ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์	5,000 บาท
2.4 ค่าวัสดุการศึกษา เช่น สารมาตรฐาน 3-hydroxypropionic acid สารละลายมาตรฐานกรดอินทรีย์ต่าง ๆ วิตามิน B1 วิตามิน B12 เป็นต้น	10,000 บาท
2.5 ค่าวัสดุสำนักงาน	4,000 บาท
2.6 ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง	5,000 บาท

รวม 50,000 บาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

ประวัติส่วนตัว

นางสาวสมพิศ สอนโยธา

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ ดร.

ประวัติการศึกษา

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

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

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเสนอผลงานวิชาการ

- (1) **Sornyotha, S.**, Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L., 2003, “Study on the binding of the polysaccharide-binding protein (P195), subunit of xylanosome from *Bacillus circulans* B6 to insoluble substrate”, The 41st Kasetsart University Annual Conference, February 3-7, The Kasetsart University, Bangkok, Thailand, pp. 144-152.
- (2) **Sornyotha, S.**, Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L., 2005, “Comparison of different extraction buffers for extraction of cyanide-releasing enzyme from cassava root”, The 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Product, March 22-25, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, pp. 1-13.
- (3) **Sornyotha, S.**, Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2008, “Reduction of linamarin content in cassava root by using xylanase and cellulase”, The Pure and Applied Chemistry International Conference, January 30-February 1, Sofitel Centara Grand, Bangkok, Thailand, pp. 221-227.
- (4) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Chimtong, S., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2011, “Production of high value-added products from core pineapple”, Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.589-592.
- (5) Tachaapaikoon, C., Buakhaw, S., **Sornyotha, S.**, Pason, P., Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. and Ratanakhanokchai, K., 2011, “Thermostable plant cell wall degrading enzymes from thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* EPPO5”, Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.77-80.
- (6) Pason, P., Tachaapaikoon, C., **Sornyotha, S.**, Waeonukul, R., Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. and Ratanakhanokchai, K., 2011, “Purification and characterization xylanase subunit (280 kDa) of multienzyme complex from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6”, Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.97-100.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

(9) Sornyotha, S., Karita, S., Tachaapaikoon, C. and Ratanakhanokchai, K., 2013, "Affinity isolation and rapid identification of carbohydrate-binding proteins of xylanolytic-cellulolytic multienzyme complex from *Paenibacillus xylaniclasticus* TW1 by MALDI-TOF/TOF MS", The 1st International Symposium on Microbial Technology for Food and Energy Security, November 25-27, The Rama Gardens Hotel, Bangkok, Thailand, pp. 281-287.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้