บทความวิจัย

การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้สูงจากน้ำตาลไซโลส
Isolation and Identification of Organic Acid-Producing Bacteria from Xylose

นีรนุช ช่างทอง[1] กนก รัตนะกนกชัย[2] จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ[3] รัตติยา แววนุกูล[4]
ภัทรา ผาสอน[4*] และสมพิศ สอนโยธา[5]
Neeranuch Changthong[1], Khanok Ratanakhanokchai[2],Chakrit Tachaapaikoon[3],
Rattiya Waeonukul[4*], Patthra Pason[4] and Somphit Sornyotha[5]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลส โดยเก็บตัวอย่างในประเทศไทย 401 ตัวอย่าง เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คัดเลือกจุลินทรีย์ที่เจริญและผลิตกรดมาคัดแยกบนอาหารแข็งที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สร้างบริเวณใสขนาดใหญ่มาตรวจสอบการผลิตกรดอินทรีย์ พบว่า LK34 ผลิตกรดมาลิกได้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก มีค่าสูงสุด 35.381 กรัม/ลิตร และให้ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.491 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย 16S rRNA พบว่าไอโซเลท LK34 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella* sp. ร้อยละ 99 ซึ่ง LK34 ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียชนิดแรกในจีนัส *Klebsiella* ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้จากน้ำตาลไซโลส

คำสำคัญ : กรดอินทรีย์ น้ำตาลไซโลส *Klebsiella* sp.

---

[1] นักศึกษาปริญญาโท สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10150
[2] รศ.ดร., สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10150
[3] ผศ.ดร., [4] อ.ดร., สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10150
[5] อ.ดร., สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[*] Corresponding author: e-mail: patthra.pas@kmutt.ac.th Tel. 02-470-7769

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

Abstract

The objective of present study is to isolate and identify the bacteria that capable of producing organic acid from xylose. A total of 401 samples were collected from Thailand and inoculated to basal medium containing 10% (v/v) xylose as the carbon source at 37°C. Microorganisms that grown and produced organic acid were purified by cross - streaking on an agar plate. The single colony was chosen for organic acid production by size of clear zone. The isolate LK34 produced malic acid as a major product with a high concentration at 35.381 g/L and productivity 0.491 g/l/h. Nucleotide sequences analysis of *16S rRNA* showed that LK34 is more similar to *Klebsiella* sp. (sequence identity, 99%). This is the first report of genus *Klebsiella* that can produce malic acid from xylose.

Keywords : Organic Acid, Xylose, *Klebsiella* sp.

บทนำ

จากการเจริญของเศรษฐกิจของโลก และการพัฒนาของประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดวิกฤตการณ์พลังงานขาดแคลน ดังนั้นจึงเป็นแรงผลักดันให้เกิดการคิดค้นพลังงานทดแทนและไบโอรีไฟเนอรีต่าง ๆ เช่น เอทานอล และกรดอินทรีย์ เป็นต้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นความสำคัญของการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซักซินิก และกรด มาลิกโดยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากการผลิตกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียยังไม่มีรายงานแพร่หลายมากนัก ที่สำคัญกรดอินทรีย์เป็นสารมูลค่าสูง มีความจำเป็นต่อมนุษย์ในชีวิตประจำวันอย่างมาก โดยใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นและรส นอกจากนี้ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น การผลิตพลาสติก การผลิตสารเคลือบผิวต่าง ๆ เป็นต้น [1] กรดอินทรีย์เป็นสารประกอบคาร์บอนิลที่มีหมู่ carboxyl เป็นหมู่ฟังก์ชั่น มีสูตรทั่วไปคือ R-COOH หรือ Ar-COOH สามารถผลิตได้จาก 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ ซึ่งวิธีทางเคมีผลิตจากสารเคมีต่าง ๆ ร่วมกับการใช้ความร้อนและความดันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีข้อดีคือ สามารถได้ผลิตภัณฑ์จำนวนมาก และใช้เวลาสั้น แต่ทำให้เกิดของเสียที่ทำลายสิ่งแวดล้อมและมีราคาแพง ส่วนวิธีทางชีวภาพ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ มีข้อดีคือ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ราคาประหยัด และสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่มีข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลานานและได้ผลผลิตน้อย [1] ซึ่งปัญหาดังกล่าวแก้ไขได้โดยการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงรวมถึงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตและลดระยะเวลา

ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลกลูโคสเป็นจำนวนมาก เช่น *Penicillium viticola* 152 ซึ่งสามารถผลิตแคลเซียมมาเลทในถังหมักขนาด 10 ลิตร ได้สูงสุดเท่ากับ 168 กรัม/ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 1.288 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 1.750 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 40 กรัม/ลิตร โดยมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบ/วินาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง [2] และมีรายงานว่า *Aureobasidium pulllans* ผลิตกรด poly (β-L-malic acid) โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 3 เป็นเวลา 7 วัน โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm พบว่าสามารถผลิตกรด poly (β-L-malic acid) ได้ 62.270 กรัม/ลิตร จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 120 กรัม/ลิตร [3] จากรายงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลสโดยแบคทีเรีย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก และจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นกรดอินทรีย์

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

วิธีการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลส

คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน (SK) ใบไม้ (LK) ดอกไม้ (FK) ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน และ ผลไม้ (FM) ลูกแป้งข้าวหมาก (PM) อาหารดอง (DM) จากตลาดสี่มุมเมืองจังหวัดปทุมธานี และตัวอย่างดินจากโรงงานน้ำตาลจังหวัดราชบุรี (ML) รวมทั้งหมด 401 ตัวอย่าง นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว Basal พีเอช 7.0 (4) โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมกรด โพรพิออนิก ร้อยละ 0.010 ปริมาตร/ปริมาตร โดยนำตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที คัดแยกตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ (อาหารขุ่น) ถ่ายลงอาหารเหลว Basal ชนิดเดียวกัน 3 รอบ

นำตัวอย่างที่ตรวจพบการเจริญของจุลินทรีย์และมีค่าพีเอชในอาหารต่ำกว่า 5.0 มาคัดแยกโคโลนีบริสุทธิ์บนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร (Agar plate screening) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งโคโลนีเจริญบนอาหารแข็งและเกิดบริเวณใส จากนั้นเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ที่สร้างบริเวณใสขนาดใหญ่ มาเลี้ยงในอาหารแข็งเอียง (slant) ชนิดเดียวกัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์

นำโคโลนีที่สร้างบริเวณใสขนาดใหญ่มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร [4] โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้มีค่า optical density (OD_{600}) ประมาณ 0.5 (38 x 108 CFU/mL) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งใช้คอลัมน์ Aminex ® HPX-87H (300x7.8 mm) อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 โมล และใช้ UV-VISIBLE เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้สารละลายมาตรฐานเป็นกรดมาลิก กรดฟูมาลิกและกรดซักซินิก (บ. Sigma-aldrich) จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์สูงสุดไปตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย และนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้สูงที่สุด มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งและนำไปย้อมแกรมตามวิธีใน Begey’s Manual of Systematic Bacteriology และตรวจสอบลักษณะของโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้ 8F (5’AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (5’ACGGCTACCTTGTTACGACTT) เป็น primers สำหรับโคลนยีน หลังจากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียที่คัดเลือก และเปรียบเทียบกับลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases)

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

การศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดอินทรีย์

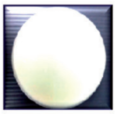
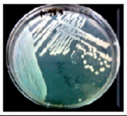
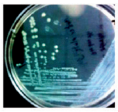
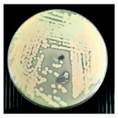
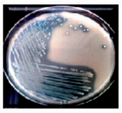
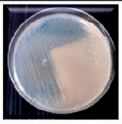
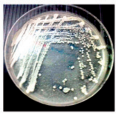
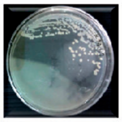
ศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยเตรียมอาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่าง ๆ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson [5] ค่าพีเอช และวัดความเจริญของแบคทีเรีย

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลส

จากการคัดแยกตัวอย่างต่าง ๆ จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) ตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี และโรงงานน้ำตาลจังหวัดราชบุรี จำนวน 401 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเหลว Basal พีเอช 7.0 โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 106 ตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตและทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 5.0 จากนั้นนำตัวอย่างมาคัดแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งโคโลนีเจริญและเกิดบริเวณใส จากผลการทดลองพบว่าโคโลนีบริสุทธิ์ 5 ไอโซเลท คือ LK33, LK34, ML5, FM6.2 และ DM6.3 สามารถเจริญและผลิตกรดได้สูงเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน สังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลักษณะบริเวณใสของจุลินทรีย์สายพันธ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน

Isolates	Clear zone	Isolate	Clear zone
Control		LK33	
Ay12		LK34	
Zoo17		ML5	
KMUTT5		FM6.2	
KMUTT21		DM6.3	

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลส

จากนั้นนำเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ LK33, LK34, ML5, FM6.2 และ DM6.3 มาผลิตกรดอินทรีย์ในอาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจวัดชนิดกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC จากผลการทดลองพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลทผลิตกรดมาลิก กรดซักซินิกและกรดฟูมาลิกได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลท LK33, LK34 และ ML5 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงคือ24.163±0.458, 30.903±0.958 และ 23.092±0.320 กรัม/ลิตรตามลำดับ ส่วนไอโซเลท FM6.2 และ DM6.3 ผลิตกรดมาลิกได้เพียง 0.237±0.024 และ 0.343±0.036 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดซักซินิกพบว่ามีเพียงไอโซเลท LK34 ที่ผลิตได้สูง (1.161±0.037 กรัม/ลิตร) ในขณะที่ 4 ไอโซเลทสามารถผลิตกรดกรดซักซินิกได้น้อย (ระหว่าง 0.059-0.625 กรัม/ลิตร) ส่วนการผลิตกรดฟูมาลิกพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลทผลิตได้ปริมาณน้อยมาก (ตารางที่ 2) จากการทดลองพบว่าไอโซเลท LK34 ที่คัดแยกได้จากใบไม้ผลิตกรดมาลิกได้สูงที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากใบไม้เป็นของสดเมื่อเกิดการทับถมกันน่าจะเกิดการหมักให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์ อย่างไรก็ตามในธรรมชาติแบคทีเรียสามารถผลิตกรดมาลิกได้โดยนำน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วัฏจักร tricarboxylic acid โดยผ่านทางวัฏจักร pentose phosepate และถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางชนิดอื่น ๆ จนเกิดเป็นกรดมาลิก [6] หรืออาจจะเกิดขึ้นจากกระบวนการ pyruvate carboxylation – oxalacetate reduction pathway ซึ่งไพรูเวท ถูกเปลี่ยนเป็นกรดออกซาโลอาซิติกและกรดมาลิกตามลำดับก่อนส่งออกนอกเซลล์ จึงทำให้ตรวจวัดปริมารกรดมาลิกที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ [2]

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดมาลิก กรดซักซินิกและกรดฟูมาลิกที่แบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ผลิตขึ้น ND (Not Detectable) หมายถึงไม่สามารถตรวจสอบได้

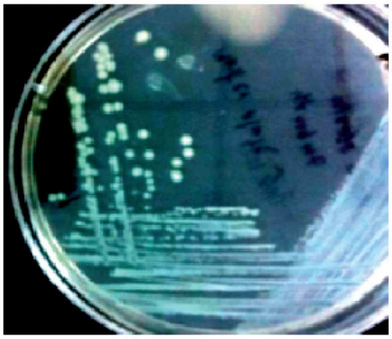
Isolates	Organic acids (g/L)		
	Malic acid	Succinic acid	Fumaric acid
LK 33	24.163±0.458	0.625 ±0.085	0.001±0.000
LK 34	30.903±0.958	1.161±0.037	0.002±0.001
ML 5	23.092±0.320	0.218±0.011	0.001±0.000
FM 6.2	0.237±0.024	0.059±0.005	ND*
DM 6.3	0.343±0.036	0.412±0.007	0.002±0.001

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

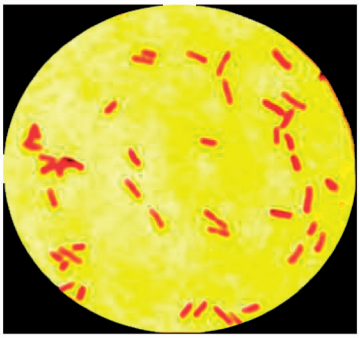
ไอโซเลท LK34 สามารถผลิตกรดมาลิกและกรดซักซินิกได้สูงสุด จึงนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ มีสีขาวขุ่นมันวาว ยกตัวจากพื้นผิวเล็กน้อย (ภาพที่ 1a) จากนั้น นำมาย้อมแกรมตามวิธีใน Begey’s Manual of Systematic Bacteriology และตรวจสอบลักษณะของโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100× พบว่า เซลล์มีรูปแท่ง และติดสีแดงของซัลฟานิน แสดงว่าไอโซเลท LK34 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (ภาพที่ 1b) และจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้ฐานข้อมูลโปรแกรม BLAST ของ NCBI databases พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LK34 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella* sp. ร้อยละ 99

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

a)



b)

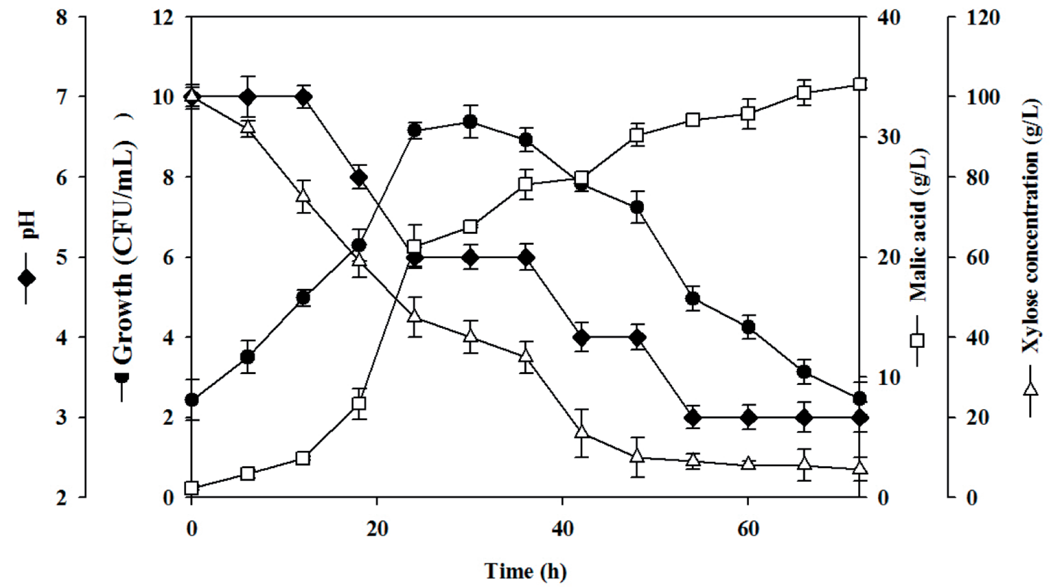


ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท LK34 บนอาหารแข็ง (a) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100× (b)

การศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดอินทรีย์

นำแบคทีเรียไอโซเลท LK34 มาศึกษาความสามารถในการเจริญและติดตามการผลิตกรดมาลิกที่เป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ1 น้ำหนัก/ปริมาตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมเชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในระยะ log phase ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรก และจะเข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วงเวลา 24-36 ชั่วโมงต่อมาได้เข้าสู่ระยะ death phase ในช่วงเวลา 36-72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัม/ลิตร และลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลาเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งในชั่วโมงที่ 72 เหลือเพียง 7.27 กรัม/ลิตร ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไซโลสไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆได้ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่วนค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงอย่างต่อเนื่องหลังเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ค่าพีเอชลดลงจาก 7.0 เหลือ 3.0 ปริมาณพีเอชที่ลดลงเนื่องจากปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตเพิ่มสูงขึ้น และกรดมาลิกผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 มีค่า 35.381 กรัม/ลิตร ค่า Productivity เท่ากับ 0.491 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในการทดลองนี้พบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำหน้าที่ช่วยรักษาค่าพีเอชในระบบไม่ให้ลดลงอย่างรวดเร็ว [7] และพบว่า สาเหตุที่แบคทีเรีย LK34 สามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสได้ อาจเนื่องจากน้ำตาลไซโลสไปเหนี่ยวนำยีนบางยีนใน *Klebsiella* sp. ให้เกิดผลิตกรดมาลิกเพิ่มขึ้นซึ่งน่าจะแตกต่างจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์อื่นๆ ที่เลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากการค้นคว้าในฐานข้อมูลวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรีย LK34 เป็นสายพันธุ์แรกในจีนัส *Klebsiella* ที่สามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลส และใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการผลิตเพียง 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ (ตารางที่ 3)

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557



ภาพที่ 2 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงการเจริญของแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาไซโลส พีเอช และปริมาณกรดมาลิกของแบคทีเรียไอโซเลท LK34 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบการผลิตกรดมาลิกจากแบคทีเรีย LK34 กับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ

Microorganism	**Bioreactor/ C-source**	**Product (g/L)**	**Time (hr)**	**Productivity (g/l/h)**	**Yield (g/g sugar)**	**Reference**
Aureobasidium pullulans	Shake flask/ Glucose	PMLA 62.27	168	0.37	0.77	[8]
Aureobasidium sp. P6	Shake flask/ Glucose	PMLA 100.70	168	0.59	0.72	[9]
***K. pneumoniae* LK39**	**Shake flask/** Xylose	**Malic acid 35.38**	**72**	**0.49**	**0.35**	**This study**

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ได้สูงจากแหล่งต่าง ๆ (401 ตัวอย่าง) พบว่าไอโซเลท LK34 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงที่สุด และเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella* sp. ร้อยละ 99 เมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตกรดมาลิกที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าในชั่วโมงที่ 72 ไอโซเลท LK34 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงที่สุดเท่ากับ 35.381 กรัม/ลิตร และค่า Productivity เท่ากับ 0.491 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินหมวดเงินอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2557-2559 ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

[1] Jeong, W. L., Hyun, U., Kim., Sol, C., Jongho, Y., and Sang, Y. L. (2011). "Microbial production of building block chemicals and polymers", **Current Opinion in Biotechnology.** 22, 758-767.

[2] Ibrar, K., Kiran, N., Zhi-Peng, W., Guang-Lei, L., and Zhen-Ming, C. (2013). "Calcium malate overproduction by *Penicilluium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor", **Applied Microbiology and Biotechnology.** 98 (4), 1539-1546.

[3] Huili, Z., Jin, C., Jiaqi, D., Danping, Z., Lei, H., Zhinan, X., and Peilin, C. (2011). "High – level production of poly (β-L-malic acid) with a new isolate *Aureobasium pulluans* strain", **Applied Microbiology and Biotechnology.** 92 (2), 295-303.

[4] Takeshi, T., Teruhide, Tsuguo, I., Tadaatsu, N., and Junta, S. (1981). "Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus Candida", **Agricultural Biology and Chemistry.** 45, 475-479.

[5] Somogyi, M. (1952). "Notes in sugar determination", **Journal of Biological Chemistry.** 195, 19-23.

[6] Schmidt, A., Windisch, C., and Holler, E. (1996). "Nuclear accumulation and homeostasis of the unusual polymer poly (L-malate) in plasmodia of *Physarum polycephalum*", **European Journal of Cell Biology.** 70, 373-380.

[7] Yan, M., Guang, Y. W., Guang, L. L., Zhi, P. W., and Zhen, M. C. (2013). "Overproduction of poly (β-malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium* sp. P6 strain isolated from mangrove system", **Applied Microbiology and Biotechnology.** 97, 8931-8939.

[8] Zhang, H., Cai, J., Dong, J. Zhang, D., Huang, L., Xu, Z., and Cen, P. (2011) "High-level production of poly (β-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain", **Applied Microbiology and Biotechnology.** 92, 295-303.

[9] Ma, Y., Wang, G.Y., Liu, G.L., Wang, Z.P., and Chi, Z.M. (2013). "Overproduction of poly (β-malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium* sp. P6 strain isolated from mangrove system", **Applied Microbiology and Biotechnology.** 20, 8931-8939.