รหัสโครงการ SUT3-304-58-24-01

รายงานการวิจัย

การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไล ที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122

(Succinic Acid Production from Cassava Starch and Pulp by Metabolically Engineered *Escherichia coli* KJ122)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-58-24-01

รายงานการวิจัย

การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไล ที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122

(Succinic Acid Production from Cassava Starch and Pulp by Metabolically Engineered *Escherichia coli* KJ122)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันต๊ะมา

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนทร กาญจนทวี

ดร. อภิชัย สาวิสิทธิ์

นางสาวคิริน โฆ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้แล้วเสร็จสมบูรณ์ด้วยความเรียบร้อย รวมทั้งขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่ ตลอดถึงความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัย ท้ายที่สุดขอขอบคุณ ดร. อภิชัย สาวิสิทธิ์ และนางสาวคีรีน โฆ (ผู้ช่วยวิจัย) เจ้าหน้าที่และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทุกคนที่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องและให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2560

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122

คิริน โม อภิชัย สาวิสิทธิ์ และเขมวิทย์ จันต๊ะมา
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ซักซิเนตถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเคมีและการผลิตซักซิเนตจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นทางเลือกที่เป็นที่ต้องการมาก ทั้งนี้ความเป็นไปได้ในการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่นั้น จะขึ้นอยู่กับการใช้ประโยชน์จากแหล่งพลังงานทดแทนที่ราคาถูกกว่า ดังนั้น การนำวัตถุดิบที่ได้จากมันสำปะหลังมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตซักซิเนตอาจทำให้สามารถเพิ่มการแข่งขันทางเศรษฐกิจได้มากขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยใช้กากมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างกระบวนการย่อยและการหมักแบบขั้นตอนเดียว (SSF) และการย่อยและการหมักที่แยกออกจากกัน (SHF) จากการศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตซักซิเนตโดยเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีการสร้างและการสลาย ด้วยกระบวนการ SHF ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนอย่างง่าย พบว่าซักซิเนตที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 41.46±0.05 g/L มีค่าผลได้เท่ากับ 82.33±0.14 g/100 g กากมันสำปะหลังแห้ง และมีอัตราผลผลิตเท่ากับ 0.84±0.02 g/L/h สำหรับการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยการใช้กระบวนการ SSF แบบกะ ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น12% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (AMG) 2% และเอนไซม์เซลลูเลส (Cel) 3% (w/v) ในการย่อย ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตซักซิเนตที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 80.86±0.49 g/L มีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 70.34±0.37 g/100 g กากมันสำปะหลังแห้ง พร้อมด้วยอัตราการผลิตเท่ากับ 0.84±0.01 g/L/h และเมื่อใช้กระบวนการ SSF แบบกึ่งกะในการผลิตซักซิเนต พบว่าสามารถช่วยทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 98.63±0.12 g/L มีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 71.64±0.97 g/100 g กากมันสำปะหลังแห้ง และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 1.03±0.01 g/L/h จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและความคุ้มทุนในการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการ SHF และ SSF โดยเชื้อ *E. coli* KJ122 เมื่อพิจารณาในส่วนของการนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตซักซิเนต โดยซักซิเนตที่ผลิตได้จากกระบวนการ SSF แบบกะภายใต้สภาวะในการผลิตที่เหมาะสมที่สุดในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีค่าเท่ากับ 70.1±0.10 g/L มีค่าผลได้เท่ากับ 1.00±0.01 g/g กลูโคส และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.97±0.01 g/L/h เมื่อทำการปรับปรุงการผลิตซักซิเนตต่อไปโดยใช้กระบวนการ SSF แบบกึ่งกะ พบว่าสามารถช่วยทำให้ค่าความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้ (82.5±0.7 g/L) ค่าผลผลิตได้ (1.03±0.01 g/g กลูโคส) ค่าเฉลี่ยอัตราการผลิต (1.15±0.01 g/L/h) และค่าอัตราการผลิตจำเพาะ (456 mg/g CDW/h) มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนตที่มีค่าผลผลิตได้ทางทฤษฎีสูงสุดเท่ากับ 92% และให้ค่าอัตราการผลิตจำเพาะสูงที่สุดเท่าที่เคยมีรายงานมา ทั้งนี้ค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตและค่าอัตราการผลิตจำเพาะที่ได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลังในการศึกษานี้มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นอย่างมาก ฉะนั้น เชื้อ *E. coli* KJ122 อาจสามารถใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตซักซิเนตเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพและความคุ้มทุนในทางเศรษฐศาสตร์ได้

Succinic Acid Production from Cassava Starch and Cassava Pulp by Metabolically Engineered *Escherichia coli* KJ122

Kirin Khor Apichai Sawisith and Kaemwich Jantama
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology

Succinate has been widely used in chemical industries and its microbial production is a desirable option. The feasibility of bio-based succinate production on an industrial scale strongly depends on the utilization of cheaper renewable resources. The use of cassava materials may make the fermentation process of succinate more economically competitive. In this study, cassava pulp and cassava starch were used as carbon substrate for succinate production during simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and separate hydrolysis and fermentation (SHF) by *Escherichia coli* KJ122. With cassava pulp as the substrate, a metabolically engineered *E. coli* KJ122 was efficiently utilized for succinate production from cassava pulp during batch separate hydrolysis and fermentation (SHF) under simple anaerobic conditions. Succinate concentration of 41.46±0.05 g/L with yield and productivity of 82.33±0.14 g/100 g dry pulp and 0.84±0.02 g/L/h was obtained. In batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF), hydrolysis of 12 % (w/v) cassava pulp with an enzyme loading of 2 % AMG + 3 % Cel (v/w) at pH 6.5 was optimized at 39 °C. Succinate concentration of 80.86±0.49 g/L with a yield of 70.34±0.37 g/100 g dry pulp and a productivity of 0.84±0.01 g/L/h was attained using *E. coli* KJ122. Fed-batch SSF significantly enhanced succinate concentration to 98.63±0.12 g/L at yield and productivity of 71.64±0.97 g/100 g dry pulp and 1.03±0.01 g/L/h. This result indicated an efficient and economical succinate production from cassava pulp using SHF and SSF by the use of *E. coli* KJ122. Considering to cassava starch as the substrate, the parameters affecting succinate production from cassava starch by *E. coli* KJ122 were optimized. A succinate concentration of 70.1±0.1 g/L was produced with a yield of 1.00±0.01 g/g substrate and productivity of 0.97±0.01 g/L/h during batch SSF in a 2 L fermenter under optimized conditions. Further improvements in succinate concentration (82.5±0.7 g/L), yield (1.03±0.01 g/g glucose), and average and specific productivities of 1.15±0.01 g/L/h, and 456 mg g CDW/h, respectively, were observed in fed-batch SSF. *E. coli* KJ122 produced a succinate yield of 92% of theoretical maximum and the highest specific productivity ever reported. Succinate production yield and specific productivity from cassava starch in this study are superior to other previously published works. *Escherichia coli* KJ122 may be used as a biocatalyst for cost-effective succinate production.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญเรื่อง ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูปภาพ ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 3
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย 3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 10
วิธีดำเนินการวิจัย 10
สถานที่ทำการทดลอง 21
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 22
ผลของการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลชนิดต่างๆ 22
องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง 23
ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายกากมันสำปะหลังแห้งบด
ที่ผ่านกระบวนการย่อย (hydrolysate) 26
การผลิตซักซิเนตด้วยวิธีการย่อยกากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาลก่อนนำ
เข้าสู่กระบวนการหมัก (separate hydrolysis and fermentation, SHF) 30
การผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการย่อยและการหมักในขั้นตอนเดียว 35
ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง 35
ผลของอุณหภูมิ 36
ผลของความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง 37
การผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมัก
แบบ SSF แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร 39

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

การผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการผลิตแบบการ SSF แบบกึ่งกะ (fed-batch simultaneous sacharification and fermentation; fed-batch SSF) ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร 41
ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตซักซิเนตในระหว่างกระบวนการผลิตแบบการย่อยและการหมักในขั้นตอนเดียว (SSF) จากแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 44
ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 44
ผลของความเป็นกรด-ด่าง 45
ผลของปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ใช้ 47
ผลของอุณหภูมิ 49
การผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะและแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร 51
บทที่ 4 บทสรุป 57
สรุปผลการวิจัย 57
ข้อเสนอแนะ 57
อุปสรรค 57
บรรณานุกรม 58
ประวัติผู้วิจัย 63

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิตกรดซักซินิกได้เองตามธรรมชาติที่นำมาผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรม 5
ตารางที่ 1.2 แสดงแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ผลิตกรดซักซินิก 6
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 11
ตารางที่ 3.1 ตัวแปรต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลชนิดต่างๆ 24
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง 26
ตารางที่ 3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ระหว่างการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ 30
ตารางที่ 3.4 ค่าต่างๆ ที่ได้จากการหมักแบบ SHF ของเชื้อ *E. coli* KJ122 จากแหล่งคาร์บอน ชนิดต่างๆ 33
ตารางที่ 3.5 แสดงค่าต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF แบบกะ จากเชื้อ *E. coli* KJ122 39
ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบการผลิตซักซิเนตจากแหล่งเซลลูโลสชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ 55
ตารางที่ 3.7 เปรียบเทียบการผลิตซักซิเนตจากวัตถุดิบที่ได้จากมันสำปะหลังในการศึกษานี้การศึกษาก่อนหน้านี้ 56

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 การตัดแต่งพันธุกรรมของ *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อสร้างสายพันธุ์ KJ122 7

รูปที่ 2.1 แสดงขวดทดลองขนาด 500 mL ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่เชื่อมต่อด้วยระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักอย่างอัตโนมัติ 12

รูปที่ 2.2 แสดงถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2L 19

รูปที่ 3.1 ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (500-mL) และใช้น้ำตาลเริ่มต้น 30 g/L ที่เสริมในอาหาร AM1 25

รูปที่ 3.2 องค์ประกอบของไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังที่ได้หลังจากการย่อย 29

รูปที่ 3.3 ช่วงเวลาของการผลิตซักซิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบ SHF ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (500-mL) ใช้อาหาร AM1 ที่เสริมด้วยน้ำตาลเริ่มต้น 50 g/L 34

รูปที่ 3.4 ผลของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *E. coli* KJ122 36

รูปที่ 3.5 ผลของอุณหภูมิในการหมักที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *E. coli* KJ122 37

รูปที่ 3.6 ผลของความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 อุณหภูมิในการหมักที่ 39 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *E. coli* KJ122 38

รูปที่ 3.7 ระยะเวลาในการผลิตซักซิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบ SSF แบบกะ ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร 41

รูปที่ 3.8 แสดงระยะเวลาในการผลิตซักซิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบ SSF แบบกึ่งกะด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร 43

รูปที่ 3.9 แสดงการผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ ภายใต้สภาวะการผลิต: ปริมาณเอนไซม์ 500 U AMG/g (แป้งมันสำปะหลัง), ความเร็วในการกวน 200 rpm, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 0.1 OD_{550} 45

รูปที่ 3.10 แสดงระยะเวลาในการหมักแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 70 g/L ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในการผลิตซักซิเนตโดยใช้กระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่างๆ 47

รูปที่ 3.11 แสดงผลของปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ 49

รูปที่ 3.12 แสดงผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อ การผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ 51

รูปที่ 3.13 แสดงระยะเวลาในการหมักแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 เพื่อผลิตซักซิเนตภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร 54

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

ACKA	=	Acetate kinase
ADHE	=	Alcohol dehydrogenase
AM1	=	Alfredo Mertinez medium version 1
AMG	=	Amyloglucosidase
Amy	=	Amylase
ANOVA	=	Analysis of variance
ATCC	=	American type culture collection
ATP	=	Adenosine 5'-tri-phosphate
AOAC	=	Association of Official Analytical Chemists
ASPC	=	Aspartate aminotransferase
°C	=	Degree Celsius
cAMP	=	cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate
CCR	=	Carbon catabolite repression
CDW	=	Dry cell weight
Cel	=	Cellulase
CFU/mL	=	Colony forming unit per Milliter (s)
CITF	=	Citrate lyase
CMC	=	carboxymethyl cellulose
CoA	=	Coenzyme A
CSL	=	Corn steep liquor
Fe-S	=	Ferrous-sulfur compound
FNR	=	Fumarate-nitrate reductase regulatory protein
g	=	Gram (s)
GalP	=	Galactose permease
Glu	=	Glucose
g/L	=	Gram (s) per liter
g/L/h	=	Gram (s) per liter per hour
h	=	Hour (s)
HPLC	=	High performance liquid chromatography
IPTG	=	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
IU/g	=	International unit (s) per gram
Kg	=	Kilogram (s)
K_m	=	Michalis constant
L	=	Liter (s)
LB	=	Luria-Bertani
LDHA	=	Lactate dehydrogenase
M	=	Molar

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

MGSA	=	Methylglyoxal synthase
mM	=	Millimolar
mg	=	Milligram (s)
mg/g	=	Milligram (s) per gram
mg/L	=	Milligram (s) per liter
min	=	Minute (s)
mL	=	Milliliter (s)
mm	=	Millimeter (s)
N	=	Normality
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized form)
NADH	=	Reduced form of Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	=	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (Oxidized form)
NADPH	=	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (Reduced form)
NR	=	Not reported
NM	=	Not measured
OD_{550}	=	Optical density at 550 nm
pNG	=	p-nitrophenyl-b-D-glucopyranoside
% (v/v)	=	Percentage volume by volume
% (v/w)	=	Percentage volume by weight
% (w/v)	=	Percentage weight by volume
% (w/w)	=	Percentage weight by weight
PEP	=	Phosphoenolpyruvate
PFLB	=	Pyruvate fomate-lyase
POXB	=	Pyruvate oxidase
PPC	=	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PTS	=	Phosphotransferase system
PYC	=	Pyruvate carboxylase
PYKAF	=	*Pyruvate kinases* A and F
rpm	=	Revolutions per minute
RSD	=	*Raw starch-degrading* enzyme
SFCA	=	Malic enzyme
sp.	=	Species
TCA	=	Tricarboxylic acid
TDCD	=	Propionate kinase

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

U	=	Unit
U/g	=	Unit (s) per gram
μL	=	Microliter (s)
μM	=	Micro molar (s)
vvm	=	Gass volume flow per unit of liquid volume per minute
SHF	=	Separate hydrolysate and fermentation
SSF	=	Simultaneous sacharification and fermentation
Xyl	=	Xylose, Xylanase
YE	=	Yeast extract

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การผลิตกรดอินทรีย์หลายๆ ชนิดสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์โดยมีสารตั้งต้นหรือวัสดุทางการเกษตรที่ไม่มีวันหมดเช่นแป้งมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลังเป็นต้น ซึ่งมีข้อดีเหนือกว่าการสังเคราะห์กรดอินทรีย์จากปฏิกิริยาเคมีที่มีปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นยกตัวอย่างเช่น ความสามารถในการผลิตที่หลากหลาย ความจำเพาะเจาะจงในการใช้สารอาหาร ความจำเพาะเจาะจงในการผลิตสารและใช้สภาวะการผลิตสารเคมีที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศเป็นต้น อย่างไรก็ตามส่วนแบ่งทางการตลาดของการผลิตสารเคมีจากเชื้อจุลินทรีย์ยังต่ำอยู่เนื่องจากกำลังการผลิตที่น้อย และต้นทุนการผลิตที่มาจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่ยังสูงอยู่ทำให้ไม่คุ้มค่ากับการผลิต จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ดีในการผลิตสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่ง รวมถึงการพัฒนากระบวนการผลิตซึ่งหมายถึงกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์จากสารอาหารคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นให้ดียิ่งขึ้น เพื่อทำการผลิตสารอินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพโดยที่ให้ผลผลิต และผลิตผลที่ดีเยี่ยม อีกทั้งต้องทำให้การผลิตสารเคมีจากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์มีความบริสุทธิ์สูงเพื่อลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากการทำให้บริสุทธิ์และมีความคุ้มทุนสามารถรองรับการขยายระดับการผลิตให้สูงขึ้นได้

ประเทศไทยมีการปลูกมันสำปะหลังกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยผลผลิตส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี ค.ศ. 2005 ทั่วโลกมีการผลิตมันสำปะหลังมากถึง 208 ล้านตันโดย 25 ล้านตันมาจากประเทศไทย มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหรือสารคาร์บอนทางกระบวนการหมัก โดยมีมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ หัวมันสำปะหลังถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ ส่วนแป้งมันสำปะหลังถูกใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ กาวและแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นกากมันสำปะหลังยังเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันซึ่งใช้เป็นเพียงอาหารสัตว์ในปัจจุบัน โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันนั้นยังคงมีแป้งที่สามารถย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และเซลลูโลสที่เมื่อทำการย่อยเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวๆ จะสามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนในการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้

กรดซักซินิกเป็นตัวอย่างของกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้เป็น building-block chemical ในการผลิตสารเคมีอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น tetrahydrofuran, 1,4-butanediol, succindiamide, succinonitrile, dimethylsuccinate, N-methyl-pyrrolidone, 2-pyrrolidone, 1,4-diaminobutane, และ gamma-butyrolactone เป็นต้น เนื่องจากกรดซักซินิกมีขนาดโมเลกุลที่เล็กทำให้สามารถใช้แทนสารเคมีอื่นๆ ที่ผลิตจากปิโตรเลียมได้ และช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารเคมีที่สังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของเบนซีนมากกว่า 250 ชนิด (Sauer et al., 2008) โดยทั่วไปการผลิตกรดซักซินิกได้จากกระบวนการเติมไฮโดรเจนให้กับสารประกอบ maleic anhydride ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และเป็นกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความดันและอุณหภูมิสูง ซึ่งทำให้การผลิตกรดซักซินิกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน ดังนั้นนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่พบในกระเพาะย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญ และสร้างกรดซักซินิกเป็นหลักในกระบวนการสร้าง และสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic conditions) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เช่น *Ruminococcus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Bacteroides rumimicola*, *B. succinogenes, B. amylophilus, Succinivibrio* spp., และ *Succinimonas* spp. เป็นต้น นอกจากนั้น

กระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดซักซินิกจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังคาดหวังที่เอื้อประโยชน์และมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม กล่าวคือแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำนวนหนึ่งโมลในทุกๆ หนึ่งโมลของกรดซักซินิกที่ถูกผลิตขึ้น ซึ่งเราสามารถประยุกต์เอากระบวนการนี้มาลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยคาดว่าจะสามารถลดผลกระทบของภาวะเรือนกระจกที่เกิดจากก๊าซนี้ได้ ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เช่นการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตเอทานอลจากยีสต์ ถ้าเรานำเอากระบวนการหมักสองส่วนนี้ผนวกเข้าด้วยกัน แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียข้างต้นต้องการอาหารที่มีความซับซ้อนซึ่งทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง

การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน และสามารถสร้างกรดซักซินิกได้เหมือนกันในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน เช่น *Escherichia coli* ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก และมากกว่าการผลิตด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งภายในสิบปีที่ผ่านมามีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้อย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ปริมาณสูงมากขึ้นประมาณ 700 mM จากอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีกูลโคสเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ภายใต้สภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน ซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมีชื่อว่า KJ122 (Jantama et al., 2008a; Jantama et al., 2008b) ถึงแม้ว่าการผลิตกรดซักซินิกจาก *E. coli* KJ122 ที่ได้จะเป็นที่น่าพึงพอใจ แต่อย่างไรก็ตามยังมีไม่มีการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อดังกล่าวจากแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลังซึ่งมีราคาถูก และมีปริมาณมากในประเทศไทยเพื่อทำการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นเพื่อให้เกิดการลดต้นทุนการผลิตกรดซักซินิกอันเนื่องมาจากการใช้สารอาหารคาร์บอนราคาถูกและมีอย่างมากมายในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างสูงในการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากวัตถุดิบทั้งสองโดยพัฒนากระบวนการหมักและหาสภาวะเหมาะสมของการผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ความสำคัญของการเป็นสารตั้งต้นที่สามารถนำไปใช้ผลิตสารสำคัญอื่น ๆ ต่อไปในอุตสาหกรรมหลายประเภท รวมถึงพอลิเมอร์ชีวภาพของกรดซักซินิกทำให้ความต้องการกรดซักซินิกที่ผลิตจากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ในตลาดโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อทดแทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตกรดซักซินิกโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาความผันผวนของราคาน้ำมันดิบในตลาดโลก อย่างไรก็ตามกำลังการผลิตของกรดซักซินิกโดยกระบวนการหมักในปัจจุบันยังไม่เพียงพอต่อความต้องการเนื่องจากอัตราการผลิตกรดซักซินิกโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ที่ได้จากกระบวนการหมักยังไม่มากพอต่อการนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์โดยตรงเนื่องจากยังมีต้นทุนการผลิตเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารอาหารคาร์บอนยังมีราคาแพงเช่นกลูโคสหรือซูโครส ทำให้ส่วนแบ่งทางการตลาดของกรดซักซินิกที่ได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ยังน้อยไม่พอต่อความต้องการ

ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัยนี้เพื่อต้องการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ E. coli KJ122 โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่ไม่มีวันหมดที่มีราคาถูกคือแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลัง ให้มีอัตราการผลิตสูง ผลผลิต และผลิตผลมากเพียงพอกับความต้องการของตลาดภายในประเทศ และสามารถที่จะนำไปต่อยอดในการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อส่งออกขายในตลาดต่างประเทศต่อไป แผนงานวิจัยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (minimal salts media) โดยมีแหล่งอาหารคาร์บอนราคาถูกเพียงอย่างเดียวเช่นกากมัน และ

แป้งมันสำปะหลัง โดยที่เราสามารถเปลี่ยนสารอาหารคาร์บอนราคาถูกที่มีอยู่อย่างมากมายในประเทศไทยไปเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง

2. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ในถังหมักแบบกะ (batch fermentation) ที่เป็นทั้งแบบดั้งเดิมที่ต้องย่อยวัตถุดิบก่อนการนำไปหมัก (separate hydrolysis and fermentation) หรือวิธีการใช้วิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว (simultaneous saccharification and fermentation) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่นความเข้มข้นของสารอาหารคาร์บอนคือกากมัน และแป้งมันสำปะหลัง อุณหภูมิ ความเป็นกรด และด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งมัน และกากมันสำปะหลังที่ให้อัตราการผลิต ผลผลิต และผลิตผลที่ดีกับวัตถุดิบ

3. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ในถังหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่เป็นทั้งแบบดั้งเดิมที่ต้องย่อยวัตถุดิบก่อนการนำไปหมัก (separate hydrolysis and fermentation) กับวิธีการใช้วิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว (simultaneous saccharification and fermentation) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้อัตราการผลิต ผลผลิต และผลิตผลที่ดีในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะกับวัตถุดิบที่เป็นแป้งมัน และกากมันสำปะหลัง เมื่อได้ข้อมูลพื้นฐานเป็นที่เรียบร้อยแล้ว เราสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตกรดซักซินิกในอุตสาหกรรมที่มีการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ และต่อเนื่องต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีการสร้างและการสลายแล้ว โดยใช้วัตถุดิบมันสำปะหลังทั้งกากมันและแป้งมันสำปะหลังที่มีอยู่มากและราคาถูกภายในประเทศ ซึ่งการศึกษาวิจัยนี้จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตกรดซักซินิกด้วยกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมที่ต้องย่อยวัตถุดิบก่อนการนำไปหมัก (separate hydrolysis and fermentation; SHF) หรือวิธีการใช้วิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว (simultaneous saccharification and fermentation; SSF) นอกจากนี้ยังจะศึกษาหาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบกะด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว ได้แก่ ค่าพีเอชของน้ำหมักระหว่างกระบวนการหมัก, อุณหภูมิในการหมัก, ความเข้มข้นของวัตถุดิบตั้งต้น, ความเข้มข้นและชนิดของเอนไซม์ผสมที่ใช้ในการย่อย เป็นต้น ตลอดจนใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการหมักแบบกะไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาการหมักด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) อีกด้วย

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เพื่อทดแทนการนำเข้าน้ำมันดิบราคาสูงจากต่างประเทศ และลดความวิตกกังวลในการขาดแคลนแหล่งน้ำมันดิบสำรองของโลก นอกจากนั้นยังเพื่อรองรับความต้องการสารเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มหาศาลในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากความต้องการใช้พลังงาน รวมถึงวัตถุดิบในการผลิตเคมีภัณฑ์ที่เกิดจากการขยายตัวของประชากรโลก และการพัฒนาเศรษฐกิจ เรามีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาวิธีการใหม่ ๆ ในการผลิตพลังงาน และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงแอลกอฮอล์ โดยไม่ต้องพึ่งพาการสังเคราะห์ทางเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งของกรดซักซินิกที่ในปัจจุบันถูกสังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของน้ำมันปิโตรเลียม ดังนั้นการผลิตกรดซักซินิกโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้จุลชีพเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาน่าจะเป็นวิถีทางเลือกที่อาจมาทดแทนการใช้

น้ำมันดิบ และผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคมีภัณฑ์ด้วยปฏิกิริยาเคมีทั้งในปัจจุบัน และอนาคต

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าประเทศไทยเราเป็นประเทศที่ประชากรส่วนใหญ่ (มากกว่า 50%) ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ผลผลิตการเกษตรที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์แป้งที่ได้จากการปลูกมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งชีวมวล (biomass) ที่สำคัญ และมีปริมาณมากจนเกินกว่าความต้องการบริโภคภายในประเทศ และเกินกว่าที่จะส่งออกขายภายนอกประเทศ ทำให้ราคาสินค้าทางการเกษตรพวกแป้ง และน้ำตาลในประเทศมีราคาตกต่ำ นอกจากนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย กากใย และทะลายปาล์ม ที่มีมากมายมหาศาลยังมีศักยภาพในการเป็นชีวมวล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกมันสำปะหลัง อย่างแพร่หลาย รวมถึงกากมันซึ่งประกอบไปด้วยเส้นใยเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ งานวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีที่จะนำเอาชีวมวลที่ได้จากผลิตผลทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาทำเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตสารเคมีสำคัญ รวมถึงกรดซักซินิกโดยใช้ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อรองรับความต้องการที่จะใช้กรดซักซินิกที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัสดุทางการเกษตร

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* KJ122 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (mineral salts media) โดยไม่ต้องการการเสริมสร้างสารอาหารเชิงซับซ้อนที่มีราคาสูง โดยงานวิจัยนี้จะนำเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อเพื่อให้เชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตกรดซักซินิกเป็นหลักในกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยทำการทดสอบการผลิตกรดซักซินิกจากแหล่งสารอาหารคาร์บอน คือ กากมันสำปะหลัง และแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีราคาถูกด้วยกระบวนการหมักแบบกะ และกึ่งกะ ทั้งแบบที่เป็นการย่อยวัตถุดิบแล้วทำการหมัก และการย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์พร้อมกับการหมักเพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกด้วยเทคโนโลยีการหมักที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพจากวัตถุดิบทั้งสองประเภท เพื่อใช้ต่อยอดในการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น จนถึงขั้นในระดับอุตสาหกรรม

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

กรดซักซินิกมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตยา วิตามิน และเครื่องสำอาง รวมถึงอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์อื่นๆ เช่นสารเคมีในบ้านเรือน และสีทาบ้าน รวมถึงนำมาใช้ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพ ทำให้ความต้องการกรดซักซินิกเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี การมีขนาดโมเลกุลที่เล็กทำให้กรดซักซินิกสามารถใช้แทนสารเคมีอื่นๆ ที่ผลิตจากปิโตรเลียม ทำให้เกิดการลดมลภาวะที่เกิดจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารเคมีที่สังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของเบนซีนมากกว่า 250 ชนิด (Ahmed and Morris, 1994) การผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักสามารถทดแทนและลดการใช้สารปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตกรดซักซินิก และอนุพันธ์ของกรดซักซินิก ซึ่งจะเป็นผลดีต่อประเทศในด้านการลดการนำเข้าน้ำมันดิบที่มีราคาสูงขึ้นอย่างมาก (Nordhoff et al., 2007) อีกยังผลกระทบทางด้านความเป็นพิษจากสารที่ได้ระหว่างกระบวนการสังเคราะห์กรดซักซินิกโดยใช้ปฏิกิริยาเคมี (Hatti-Kaul et al., 2007; Sauer et al., 2008)

กรดซักซินิกสามารถถูกผลิตขึ้นตามธรรมชาติระหว่างกระบวนการสร้าง และสลายน้ำตาลของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่พบในกระเพาะอาหารของสัตว์ที่เคี้ยวเอื้องเช่น วัว และควาย ยกตัวอย่างเช่น *Ruminococcus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Bryant and Small, 1956) การผลิตกรดซักซินิกในเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารเชิง

ซับซ้อน และธาตุอาหารพิเศษบางชนิดเพื่อความต้องการในการเจริญเติบโต สังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น และวิตามินต่าง ๆ รวมถึงการสร้างกรดซักซินิกในปริมาณสูงต้องอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มาทำการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นที่เกิดจากราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ และราคาก๊าซอื่นๆ ที่ใช้ในการทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด และเพิ่มมวลชีวภาพ

ตารางที่ 1.1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิตกรดซักซินิกได้เองตามธรรมชาติที่นำมาผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรม [a]

Organism	Medium/Condition[a]	Succinate Titer (mM)[b]	Reference
Actinobacillus succinogenes FZ53	130 g/l glucose supplemented with 15 g/l CSL and 5 g/l YE, 80 g/l $MgCO_3$, anaerobic batch fermentation, 78 h incubation	898 [1.36]	Guettler et al., 1996
Anaerobiospirillum succiniciproducens ATCC 53488	120 g/l glucose in peptone/YE based medium, integrated membrane-bioreactor-electrodialysis with CO_2 sparging, 150 h incubation	703 [0.55]	Meynial-Salles et al., 2007
Anaerobiospirillum succiniciproducens ATCC 53488	50 g/l glucose, 2% CSL, and 25 ppm tryptophan, neutralized with 5.5 M $NaCO_3$, saturated medium of 0.3 atm partial pressure of CO_2, 29.5 h incubation	289 [1.16]	Guettler et al., 1998
Mannheimia succiniciproducens MBEL55E KCTC 0769BP	18 g/L glucose in MH4 (YE based medium) supplemented with 119 mM $NaHCO_3$, a continuous-cell-recycle membrane reactor with the CO_2 partial pressure of 101.3 kPa gas (100% CO_2), 6 h incubation	144 [2.83]	Song et al., 2007

[a] Abbreviations: CSL, corn steep liquor; YE, yeast extract; NR, not reported.

[b] Average volumetric productivity is shown in brackets [g/l-h] beneath succinate titer.

การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน และสามารถสร้างกรดซักซินิกได้เหมือนกันในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน เช่น *E. coli* ได้รับความสนใจอย่างมาก และมีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้อย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามการผลิตกรดซักซินิกจากสายพันธุ์ตั้งต้นของ *E. coli* ตามธรรมชาติอยู่ในระดับที่ต่ำมากประมาณ 10 mM จึงได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้ *E. coli* สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ปริมาณสูงมากขึ้นประมาณ 700 mM จากอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่ไม่มีการเสริมสารอาหารเชิงซับซ้อน และมีกลูโคสเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Jantama et al., 2008b)

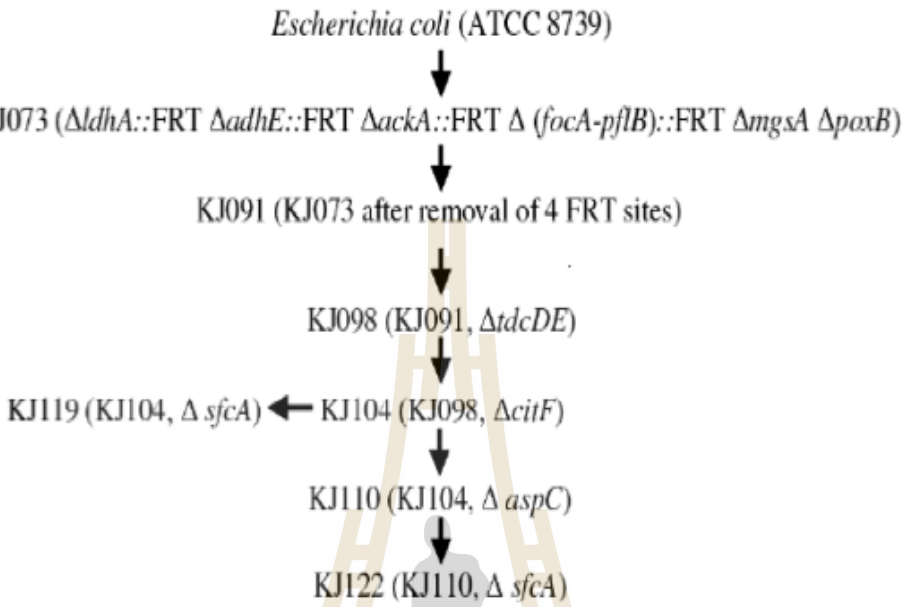
ตารางที่ 1.2 แสดงแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ผลิตกรดซักซินิก

Organism	Medium/Condition[a]	Succinate Titer (mM)[b]	Reference
E. coli AFP111 (*pflAB, ldhA, ptsG*) *Rhizobium etli pyc*	40 g/l glucose (90 g total glucose) in medium supplemented with 20 g/l tryptone, 10 g/l YE and 40 g/l $MgCO_3$, dual phase-fed batch fermentation, 76 h incubation	841 [1.31]	Vemuri et al., 2002
E. coli KJ122 (Δ*ldhA* Δ*adhE* Δ*ackA* Δ(*focA-pflB*) Δ*mgsA* Δ*poxB* Δ*tdcDE* Δ*citF* Δ*aspC* Δ*sfcA* Δ*pta-ackA*)	100 g/l glucose AM1 with 10 g/l $KHCO_3$, simple batch fermentation, 120 h incubation, pH maintained with 6:1 mixture of 6M KOH+3M K_2CO_3	606 [0.75]	Jantama et al., 2008b
E. coli KJ122-pKJSUC-24T (*cscKB* and *cscA* from *E. coli* B)	150 g/L Sugarcane molasses with 10 g/L $KHCO_3$, 10 L bioreactor simple batch fermentation, 72 h incubation, pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3	658 [0.77]	Chan et al., 2012
E. coli KJ122-pKJSUC-24T (*cscKB* and *cscA* from *E. coli* B)	70 g/L Sucrose with 10 g/L $KHCO_3$, 10 L bioreactor with simple batch fermentation, 72 h incubation, pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3	630 [0.74]	Chan et al., 2012

[a] Abbreviations: CSL, corn steep liquor; YE, yeast extract; NR, not reported.
[b] Average volumetric productivity is shown in brackets [g/l-h] beneath succinate titer.

E. coli KJ122 ถูกตัดแต่งดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ในปริมาณที่สูงในระดับห้องปฏิบัติการโดยมีอัตราการเจริญที่สูงรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่ไม่มีการเสริมสารอาหารเชิงซับซ้อน และสามารถทำการผลิตกรดซักซินิกได้ในกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะกึ่งไร้ออกซิเจนที่ความดันและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *E. coli* KJ122 นั้นถูกดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายมาจากเชื้อ *E. coli* KJ073 อีกต่อหนึ่งโดยที่สายพันธุ์นี้ถูกตัดแต่งพันธุกรรมมาจาก *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นด้วยการดัดแปลงและการทำวิวัฒนาการวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (metabolic engineering and metabolic evolution) ซึ่ง สายพันธุ์ *E. coli* KJ073 ถูกตัดจีน *ldhA, adhE, ackA, (focA-pflB), mgsA* และ *poxB* ซึ่งยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ lactate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, acetate kinase, pyruvate formate lyase, methyl glyoxylase และ pyruvate oxidase ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่ไม่ใช่กรดซักซินิก ระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาลภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นผลให้สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดซักซินิกได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ATCC 8739) และได้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 1.2 mol succinate/mol glucose used หลังจากนั้นสายพันธ์ KJ073 ถูกนำไปพัฒนาต่อเพื่อให้สามารถสร้างกรดซักซินิกในปริมาณสูงขึ้นอีกโดยการตัดจีน *tdcDE , citF, aspC* และ *sfcA* ทำให้ได้สายพันธุ์ KJ122 (รูปที่ 1.1) โดยยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับ

การสร้างเอนไซม์ threonine decarboxylase, citrate lyase, aspartate synthase และ malate dehydrogenase ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ KJ122 สามารถผลิตกรดซักซินิกความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตได้ (yield) เท่ากับ 1.46 mol succinate/mol glucose used และผลิตผลเฉลี่ย (average productivity) ที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 0.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



รูปที่ 1.1 การตัดแต่งพันธุกรรมของ *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อสร้างสายพันธุ์ KJ122 (Jantama *et al*., 2008b)

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซิเนตในระดับความเข้มข้น และผลได้ที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีกลูโคส ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย (catabolite repression) ดังนั้น Chan et al. (2012) ได้เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลซูโครสของสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ด้วยยีนที่สร้างเอนไซม์สลายซูโครส (*cscA* and *cscKB*) ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ B ซึ่งมีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ตามธรรมชาติถูกโคลนและแสดงออกใน *E. coli* KJ122 โดยที่สายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่ชื่อว่า pKJSUC อยู่ได้ถูกคัดเลือกการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Phenol Red ที่มีน้ำตาลซูโครสผสมอยู่ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารวุ้น โคลนที่ได้สามารถแสดงอาณาเขตโคโลนีสีเหลืองใสที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น และยังแสดงความสามารถในการเจริญ และการสร้างกรดอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว

หลังจากการทำวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย *E. coli* สายพันธุ์ KJ122-pKJSUC สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซักซินิกที่มีความเข้มข้นสูงโดยมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อันไม่พึงประสงค์ในระดับต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ AM1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่ 70 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสให้กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 50.52 ± 1.8 g/L (ผลิตผล 1.05 97 g/L/h) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 500 mL ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และที่ความเข้มข้น 46.59 ± 1.23 g/L (ผลิตผล 0.97 g/L/h) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 L ภายในเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่า

ยาปฏิชีวนะไม่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ122-pKJSUC ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ นอกจากนั้นกรดซักซินิกถูกผลิตที่ความเข้มข้น 47.69 ± 3.94 g/L (ผลิตผล 0.99 g/L/h) จากกากน้ำตาลอ้อย 150 g/L ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในเวลา 48 ชั่วโมง จากการเพิ่มขนาดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรพบว่ากรดซักซินิกถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้น 35.14 ± 7.53 g/L และ 65.01 ± 0.64 g/L ภายในเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองได้ตารางที่ 2 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* KJ122-pKJSUC น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อยที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจากการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากกลูโคส และซูโครสด้วย *E. coli* KJ122 ที่ได้จะเป็นที่น่าพึงพอใจแต่ยังไม่มีงานวิจัยที่การนำเอาสารอาหารคาร์บอนที่ได้จากกากมันสำปะหลัง หรือแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากในการที่จะนำเอาวัตถุดิบทั้งสองมาใช้ในการผลิตกรดซักซินิกเพื่อทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มของวัตถุดิบทั้งสองมาเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่ใช้ประโยชน์จากผลการวิจัย

ประเทศไทยมีศักยภาพอย่างมากที่จะทำการผลิตกรดซักซินิกโดยเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพจากกระบวนการหมักเนื่องจากความพร้อมทางด้านวัตถุดิบ และความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ในการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงถูกเสนอขึ้นภายใต้กรอบแนวคิดที่จะนำเอาประโยชน์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่สามารถผลิตกรดซักซินิกจากสารอาหารคาร์บอนได้หลากหลายและอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (mineral salts medium) และมีราคาถูก ไม่ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนที่มีราคาแพงเช่น yeast extract หรือ peptone เป็นต้น การผลิตยังสามารถทำได้ที่สภาวะกึ่งมีออกซิเจน (facultative anaerobic conditions) และมีการควบคุมสภาวะกระบวนการหมักอย่างง่ายๆ ทั้งนี้กระบวนการผลิตของเชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถลดข้อบกพร่องของการผลิตกรดซักซินิกแบบดั้งเดิมด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลักตามธรรมชาติ (succinate-producing bacteria) กล่าวคือในกรณีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลักที่คัดแยกได้จากธรรมชาติส่วนมากมักจะมีอัตราการผลิตกรดซักซินิกสูงในสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างยิ่งยวด (strictly anaerobic conditions) ซึ่งยากต่อการควบคุม และมีความสิ้นเปลืองจากการเพิ่มก๊าซต่างๆ เข้าสู่กระบวนการผลิต เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด และเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการธาตุอาหารเสริมบางชนิดที่จำเพาะและมีราคาแพงที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามการใช้ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการผลิตกรดซักซินิกซึ่งสามารถทำได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำราคาถูก และใช้สภาวะกึ่งไร้ออกซิเจนธรรมดาที่ไม่ต้องการเพิ่มก๊าซใดๆ ในกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ยังต้องได้รับการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการหมักเพื่อให้เหมาะสมต่อวัตถุดิบแต่ละชนิด เช่นแป้งมัน และกากมันสำปะหลังด้วยงานวิจัยที่ต่อยอดเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

งานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษาดังนั้นความรู้และเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะถูกถ่ายทอดโดยตรงกับนักศึกษาบัณฑิตศึกษาที่กำลังอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ นอกเหนือจากนั้นงานวิจัยนี้เป็นการใช้องค์ความรู้เฉพาะทางที่มีจุดมุ่งหมายระยะยาวในการถ่ายทอดเทคนิควิธีการจากมหาวิทยาลัยไปสู่ทั้งภาคเกษตรและภาคอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนากระบวนการผลิต

กรดซักซินิกจากกระบวนการหมักโดยเชื้อแบคทีเรียให้มีฐานการผลิตขนาดใหญ่ ที่จะเป็นเป้าหมายในการผลิตเพื่อการค้าในอนาคต

เนื่องด้วยหัวหน้าโครงการวิจัย มีประสบการณ์หลังจบการศึกษาในระดับปริญญาเอกภายในระยะเวลาน้อยกว่า 10 ปี ทำให้เป็นโอกาสอันดีที่แผนงานวิจัยนี้จะมีส่วนช่วยให้หัวหน้าโครงการวิจัย มีแหล่งเงินทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการทำวิจัย รวมถึงการผลิตผลงานทางวิชาการในรูปแบบต่าง ๆ เช่นบทความทางวิชาการ ยังผลให้เป็นนักวิจัยรุ่นใหม่อย่างมีคุณภาพต่อไป

นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ทั้งหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมงานวิจัยยังมีโอกาสในการถ่ายทอดความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ที่ตนเองถนัดไปยังนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทที่สนใจเข้ามามีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยที่เสนอในแผนงานวิจัยนี้ ทั้งนี้นักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทจะมีโอกาสได้เรียนรู้การปฏิบัติงานทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างมีระบบ และเป็นแบบแผนซึ่งจะเป็นพื้นฐานการสร้างบุคคลากรทางวิทยาศาสตร์ที่มีความสามารถต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัยนี้คือการตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิทยาศาสตร์ในระดับนานาชาติ เช่น Bioresource Technology เป็นต้น ซึ่งสามารถเสนอผลงานวิจัยในแง่การพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจากสารอาหารคาร์บอนราคาถูกคือแป้งมัน และกากมันสำปะหลัง นำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีจากภาคการศึกษาสู่ภาคการผลิตขนาดอุตสาหกรรมซึ่งจะเป็นการแก้ปัญหาราคาตกต่ำของปริมาณวัตถุดิบทางการเกษตรของกลุ่มพืชพลังงานที่ล้นตลาดเช่นอ้อย และมันสำปะหลังเป็นต้น ให้มาเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงต่อไปได้

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

งานวิจัยนี้สามารถทำการผลิตกรดซักซินิกจากการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ซึ่งรวมถึงสารคาร์บอนราคาถูกที่ได้จากกลุ่มพืชพลังงาน ที่มีราคาถูกไปเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอยู่สูง เพื่อรองรับกับความต้องการกรดซักซินิกไว้ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีอื่น ๆ ที่สำคัญ รวมถึงพลาสติกชีวภาพต่อไป ดังนั้นเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยนี้เมื่อสำเร็จทำให้ประเทศไทยเรามีสายพันธุ์แบคทีเรีย KJ122 ที่สร้าง กรดซักซินิก รวมถึงได้องค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีการหมักที่เหมาะสมในการนำเอาเชื้อ KJ122 จากแป้งมันและกากมันสำปะหลังเอาไว้ใช้ในการผลิตกรดซักซินิกเองภายในประเทศโดยไม่ต้องพึ่งกระบวนการผลิต กรดซักซินิกจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก หรือพัฒนากระบวนการผลิตมาจากแหล่งอื่นซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตจากการจ่ายเงินเพื่อซื้อสิทธิบัตรการผลิตจากต่างประเทศ

ดังนั้นเทคโนโลยีที่พัฒนาได้จากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถถูกนำไปถ่ายทอดเพื่อการกรดซักซินิกในระดับโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการขยายขนาดกำลังการผลิตจากการหมักแบบกะ เป็นการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ซึ่งทำให้เกิดการนำเอาองค์ความรู้ที่ถูกคิด และพัฒนาจากสถาบันการศึกษาในระดับมหาวิทยาลัยไปสู่ภาคเอกชนที่มีศักยภาพในการลงทุนการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อการค้าต่อไป ตัวอย่างโรงงานอุตสาหกรรมที่น่าจะนำเอาเทคโนโลยีการผลิต กรดซักซินิกที่พัฒนาจากงานวิจัยนี้ไปใช้ได้แก่โรงงานอุตสาหกรรมที่มีการแปรรูปสินค้าทางการเกษตรเช่นน้ำตาล และแป้งมัน โดยที่โรงงานเหล่านี้สามารถนำเอาน้ำตาล หรือแป้งมันที่ทางโรงงานผลิตได้เองมาเป็นวัตถุดิบการผลิตกรกซักซินิกอย่างครบวงจร ซึ่งมีตัวอย่างที่คล้ายคลึงให้เห็นเช่นการผลิตไบโอเอทานอลของโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยหลายแห่งในประเทศ ทั้งนี้การถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวสามารถทำได้ภายหลังจากการสิ้นสุดการดำเนินงานวิจัย

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

กากมันสำปะหลัง (Cassava pulp)

กากมันสำปะหลังได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมา ทั้งนี้กากมันสำปะหลังที่ได้จะมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 60-70% จึงต้องนำไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้ความชื้นประมาณ 10% (น้ำหนักแห้ง) ก่อนจะนำไปบดและร่อนผ่านตระแกรงขนาด 0.2 mm ซึ่งกากมันสำปะหลังที่ผ่านการลดขนาดแล้วจะนำไปเก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava Starch)

แป้งมันสำปะหลังได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมา (ประเทศไทย) โดยแป้งมันสำปะหลังจะถูกเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

แบคทีเรียและเอนไซม์

การศึกษาการผลิตกรดซักซินิกในงานวิจัยนี้จะใช้แบคทีเรียที่ผ่านการดัดแปลงวิถีการสร้างและสลายสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 (Jantama et al., 2008) สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดจัดซื้อจากบริษัทสยามวิคตอรี่ เคมิคอล จำกัด (ประเทศไทย) ซึ่งประกอบด้วย

(1) เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ (Cellulase complex, Actipro VJ-52) (เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ที่มีความสามารถในการย่อย (Activity) 2300 CMC/g และเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (Beta-Glucosidase) ที่มีความสามารถในการย่อย 570 IU/g)

(2) เอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase) มีความสามารถในการย่อย 3900 CMC/g

(3) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Alpha Amylase, SKBU) มีความสามารถในการย่อย 42,169 IU/g

(4) เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase, AG-GLU 70) ที่มีความสามารถในการย่อย 213,000 IU/g

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 เพื่อจะทำการผลิตกรดซักซินิกนั้นจะใช้อาหาร AM1 ตามรายงานของ Martinez et al. (2007) ซึ่งมีองค์ประกอบตามตารางที่ 1.1 โดยจะมีการเติมแป้งมันและกากมันจากการเตรียมข้างต้นเพื่อใช้เป็นสารอาหารคาร์บอนตั้งต้นเพื่อการผลิตกรดซักซินิก

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 (Martinez et al., 2007)

องค์ประกอบ	**ความเข้มข้น (mmol/L)**
$(NH_4)_2HPO_4$	19.92
$NH_4H_2PO_4$	7.56
Total PO_4	27.48
Total N	47.93
[a]Total K	1.00
$MgSO_4.7H_2O$	1.50
Betaine-HCl	1.00
	(µmol/L)[b]
$FeCl_3.6H_2O$	8.88
$CoCl_2.6H_2O$	1.26
$CuCl_2.2H_2O$	0.88
$ZnCl_2$	2.20
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.24
H_3BO_3	1.21
$MnCl_2.4H_2O$	2.50
Total salts	**4.1 g/L**

[a] KOH is used to neutralize betaine-HCl stock.

[b] Trace metal stock (1000X) was prepared in 120 mM HCl.

<u>สภาวะในการเลี้ยงและการเตรียมกล้าเชื้อ</u>

กล้าเชื้อ (Inoculums) จะเตรียมโดยการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้แรงกวน 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงในอาหาร AM1 ที่เสริมด้วยไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 100 mM และบีเทนไฮโดรคลอไรด์ (betaine HCl) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดซักซินิกจะเลี้ยงในขวดทดลองขนาด 500 mL (รูปที่ 2.1) โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก (Working volume) 350 mL และจะใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้ข้างต้นความเข้มข้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm (OD_{550}) เท่ากับ 0.1 (33.3 mg CDW/L) ทั้งนี้สภาวะไร้ออกซิเจนในกระบวนการหมักจะเกิดขึ้นทันทีที่แบคทีเรียเริ่มมีการเจริญและผลิตกรดอินทรีย์ขึ้น โดยกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับไบคาร์บอเนตในน้ำหมักแล้วปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาแทนที่ออกซิเจนในน้ำหมักทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนขึ้น นอกจากนี้ในระหว่างการหมักจะควบคุมค่าพีเอชอัตโนมัติด้วยการเติมสารละลายผสมของโพแทสเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 3 M และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 6 M ในอัตราส่วน 1:1

รูปที่ 2.1 แสดงขวดทดลองขนาด 500 mL ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่เชื่อมต่อด้วยระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักอย่างอัตโนมัติ

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ไขมัน เส้นใย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปริมาณ ความชื้น) ของตัวอย่างแป้งมันและกากมันจะวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ทั้งนี้ปริมาณไขมัน เส้นใยและเถ้า จะวิเคราะห์ตามรายงานของ Charles et al. (2005) ส่วนปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะวิเคราะห์ตามรายงานของ Vadivel and Janardhanan (2001)

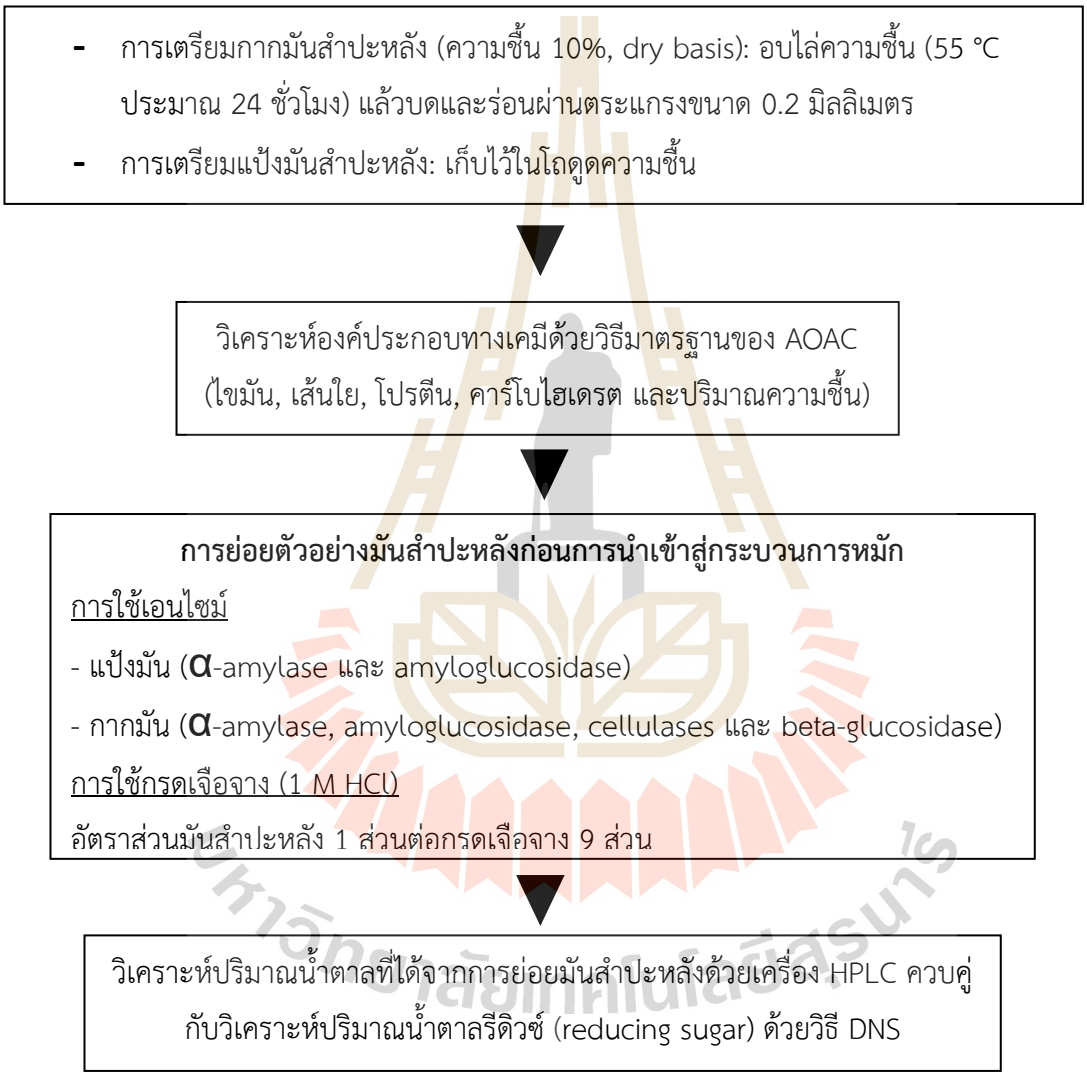
การย่อยตัวอย่างมันสำปะหลังก่อนการนำเข้าสู่กระบวนการหมัก

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)

ในการย่อยตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังจะใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีความสามารถในการย่อย 42,169 IU/g และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่มีความสามารถในการย่อย 213,000 IU/g โดยการย่อยจะเริ่มจากการละลายตัวอย่างมันสำปะหลัง 90 กรัม ในสารละลายแอมโนเนียฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 มิลลิลิตรแล้วเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 0.3% (v/v) ที่ pH 6.0 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสในปริมาณ 0.5% (v/v) ที่ pH 4.5 ก่อนที่จะนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดกระบวนการย่อยนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยด้วยวิธี DNS

(Jesse et al., 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography)

<u>แผนผังสรุปวิธีการเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้ในการวิจัย</u>



กากมันสำปะหลัง (Cassava pulp)

สำหรับการย่อยตัวอย่างกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์จะเริ่มจากนำกากมันสำปะหลังไปละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน กากมัน 1 กรัมต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร แล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ปริมาณ 0.2% (v/v) เพื่อทำการย่อยโครงสร้างของเซลลูโลส จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 0.3% (v/v) ที่ pH 6.0 แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสปริมาณ 0.5% (v/v) ที่ pH 4.5 ก่อนที่จะนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse et al., 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมกากมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยกรดเจือจาง

การเตรียมกากมันโดยการย่อยด้วยกรดเจือจางจะดัดแปลงจากวิธีของ Thongchul et al. (2010) ที่ใช้กรดไฮโดรคลอลิกเจือจางความเข้มข้น 1 M (ตัวอย่างกากมัน 1 g ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 1 M ปริมาณ 9 mL) โดยจะนำตัวอย่างสารละลายกากมันที่เติมกรดแล้วไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) จากนั้นนำตัวอย่างไปกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วปรับค่าพีเอชของสารละลายให้ได้ค่าพีเอช 10.0 ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนที่ตกตะกอนออกโดยใช้ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที หลังจากนั้นปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอลิกให้ได้พีเอชเป็นกลาง (พีเอช 7.0) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนที่ตกตะกอนออกอีกครั้ง สุดท้ายนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยด้วยวิธี DNS (Jesse et al., 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การออกแบบการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยนี้จะใช้วัตถุดิบที่ได้จากมันสำปะหลังทั้งแป้งมันสำปะหลังและกากมันเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตกรดซักซินิกโดยกระบวนการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะด้วยแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 ซึ่งวิธีการทดลองทั้งหมดของการศึกษาวิจัยนี้จะประกอบด้วย 5 ส่วนหลักๆ ดังนี้

ศึกษาชนิดของเอนไซม์และความเข้มข้นในการย่อยกากมันสำปะหลัง และแป้งมันสำปะหลังเพื่อให้เกิดการคุ้มค่าทางเศรษฐกิจและมีประสิทธิภาพของการผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อ KJ122

การศึกษาชนิดของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลังจะดัดแปลงจากการศึกษาของ Chen *et al*. (2011) ซึ่งจะทดลองในขวดทดลองขนาด 250 mL ใช้ปริมาณสารละลาย (working volume) 150 mL สำหรับการย่อยก็จะเริ่มจากการนำกากมันสำปะหลัง (10%, น้ำหนักแห้ง) ไปผสมกับสารละลายแอมโมเนียฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 (เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในอาหาร AM1) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พักให้เย็นก่อนเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์, ไซลาเนส, แอลฟาอะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส ซึ่งชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลองจะเป็นการผสมของเอนไซม์แต่ละชนิดกล่าวคือ 1) เอนไซม์เซลลูเลส คอมเพล็กซ์+ไซลาเนส+แอลฟาอะไมเลส+อะไมโลกลูโคซิเดส 2) เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์+ไซลาเนส+แอลฟาอะไมเลส 3) เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์+

ไซลาเนส 4) เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์+แอลฟาอะไมเลส+อะไมโลกลูโคซิเดส 5) เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์+ไซลาเนส+อะไมโลกลูโคซิเดส 7) ไซลาเนส+แอลฟาอะไมเลส+อะไมโลกลูโคซิเดส 8) เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ หรือ ไซลาเนส หรือ แอลฟาอะไมเลส หรือ อะไมโลกลูโคซิเดส เป็นต้น ในปริมาณ 2% (w/w, ต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสใช้แรงกวนคงที่ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สุดท้ายนำไปแยกส่วนกากที่เหลือออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทั้งหมดด้วยเครื่อง HPLC ควบคู่กับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

ในกรณีของแป้งมันสำปะหลังจะทำวิธีเดียวกันกับข้างต้นแต่จะการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส ในปริมาณ 2% (w/w, ต่อน้ำหนักของแป้งมัน) เท่านั้น

แผนผังสรุปในการย่อย

กากมันอบแห้ง (10%, dry basis) ผสมกับแอมโมเนียฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0

▼

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

▼

เติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ (α-amylase, amyloglucosidase, cellulases, beta-glucosidase และ xylanase ความเข้มข้น 2% (w/w, on dry matter)

▼

บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กวนต่อเนื่อง 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

▼

ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกกากที่เหลือ (13,500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที)

▼

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยเครื่อง HPLC ควบคู่กับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี DNS

การศึกษาชนิดของเอนไซม์กากมันสำปะหลัง

ศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 ในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ สำหรับการเจริญและผลิตกรดซักซินิก ซึ่งจะใช้เป็นการทดลองควบคุมของการใช้วัตถุดิบกากมันสำปะหลังในการผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ดังนั้นการทดลองนี้จะใช้ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ตลอดจนน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 50 g/L เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในการผลิตกรดซักซินิก โดยตัวอย่างน้ำตาลที่ทดสอบจะเป็นน้ำตาลที่พบได้หลังจากกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส มอลโทส ไซโลส อะราบิโนส กาแล็กโทสและแมนโนส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบโดยทั่วไปในสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ทั้งนี้จะทำการทดลองในขวดทดลองขนาด 500 mL ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อที่ 13.1 และจะใช้อาหาร AM1 ใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น OD_{550} เท่ากับ 0.1 ควบคุมค่าพีเอชของน้ำหนักให้คงที่ที่ค่าพีเอช 7.0 ด้วยสารละลายผสมของโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 3 โมลาร์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 ในระหว่างการหมักจะสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ทุกๆ 8 ชั่วโมงจนครบ 96 ชั่วโมง

แผนผังสรุปศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122

เตรียมกล้าเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้แรงกวน 100 rpm ในอาหาร AM1 ที่เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 30 g/l, 100 mM bicarbonate และ 1 mM Betaine HCl

▼

ถ่ายกล้าเชื้อ OD_{550} (0.1) ลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร AM1 เสริมด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ [น้ำตาลกลูโคส, มอลโทส, ไซโลส, อะราบิโนส, กาแล็กโทส, แมนโนส และน้ำตาลผสมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร]

▼

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ใช้แรงกวน 150 rpm ควบคุมค่าพีเอชของน้ำหนักให้คงที่ที่ 7.0 ด้วย 6 M KOH+3M K_2CO_3 (อัตราส่วน 1:1)

▼

สุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ทุกๆ 12 ชั่วโมง

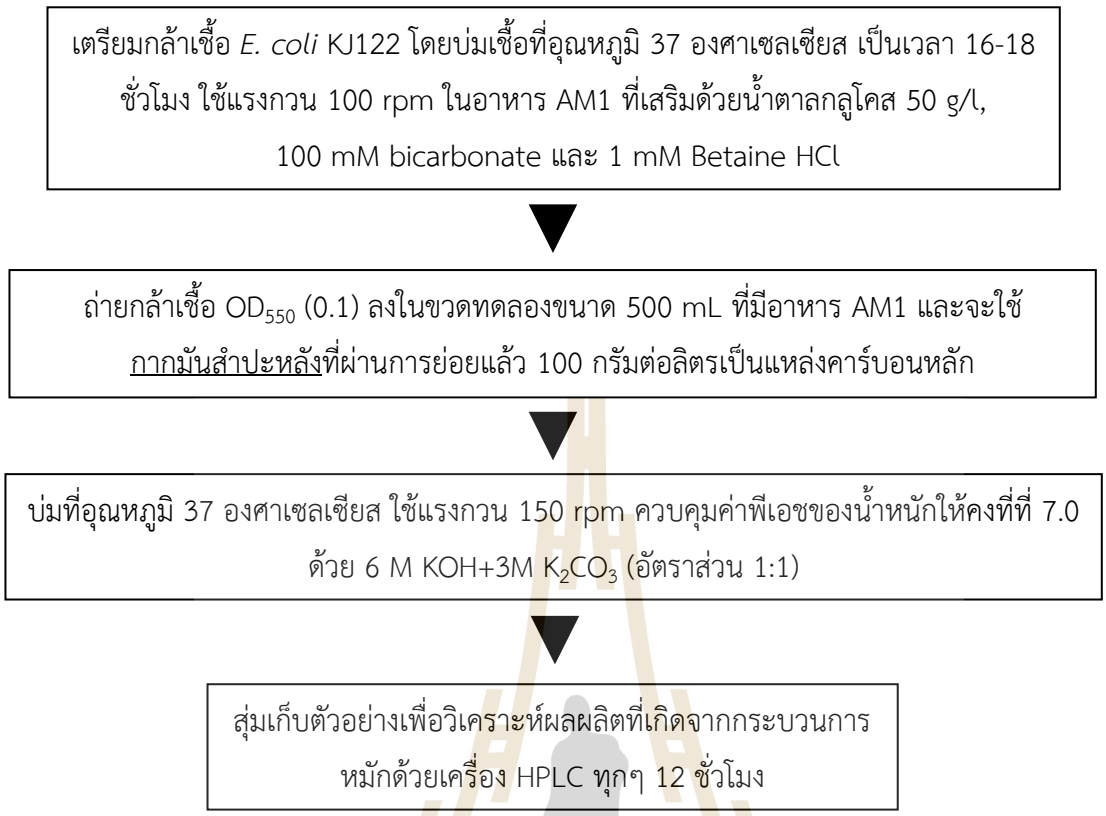
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยน้ำตาลที่ย่อยได้จากมันสำปะหลัง ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and batch fermentation, SHF) ด้วยเชื้อ KJ122

ในการทดลองนี้จะใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนหลักสำหรับผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 สำหรับวิธีการทดลองจะทำเช่นเดียวกันกับรายละเอียดที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 13.3.2 กล่าวคือ จะทำการทดลองในขวดทดลองขนาด 500 mL และใช้อาหาร AM1 ใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น OD_{550} เท่ากับ 0.1 ควบคุมค่าพีเอชของน้ำหมัก (fermentation broth) ให้คงที่ที่ 7.0 ด้วยสารละลายผสมของโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 3 M และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 M ในอัตราส่วน 1:1 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยในระหว่างการหมักจะสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ทุกๆ 8 ชั่วโมงจนครบ 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

<u>แผนผังสรุปการศึกษากระบวนการหมักกรดซักซินิกแบบกะด้วยน้ำตาลที่ย่อยได้จากกากมันสำปะหลังก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก</u>

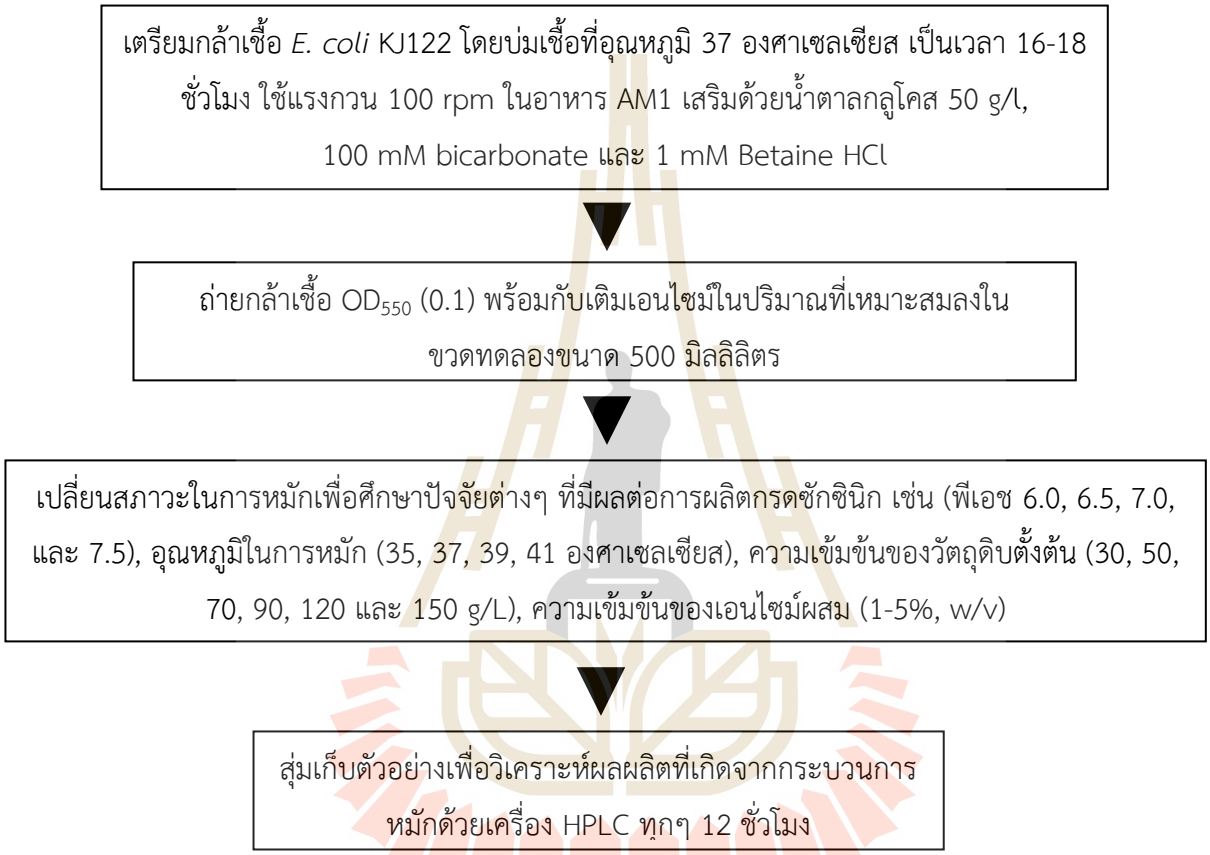


ศึกษาปัจจัยด้านค่าความเป็นกรดและด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของวัตถุดิบตั้งต้น และชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้งมัน และกากมันสำปะหลัง ที่มีผลต่อการผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับการหมักแบบกะในขั้นตอนเดียว (Simultaneous saccharification and batch fermentation, SSF-batch) ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122

กระบวนการหมักแบบกะควบคู่กับการย่อยในขั้นตอนเดียวจะทดลองในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร (รูปที่ 2.1) โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 350 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้แป้งมันและกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในกระบวนการผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในอาหาร AM1 ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 ใส่กล้าเชื้อ OD_{550} เท่ากับ 0.1 ทั้งนี้จะใส่กล้าเชื้อและเอนไซม์พร้อมๆ กันก่อนนำไปหมัก นอกจากนี้ในการทดลองจะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซักซินิกด้วยกระบวนการหมักแบบกะควบคู่กับการย่อยในขั้นตอนเดียว ได้แก่ ค่าพีเอช (พีเอช 5.0, 5.5, 6.5, และ 7.0), อุณหภูมิในการหมัก (30, 35, 37, 39, 41 องศาเซลเซียส), ความเข้มข้นของวัตถุดิบตั้งต้น (50, 70, 90, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร), ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม (1-5%, w/v) [1X เอนไซม์ผสมเท่ากับ 10 FPU/g cellulase, β-glucosidase (6 IU/g), α-amylase (55 IU/g), และ amyloglocosidase (255 IU/g)] ในกรณีของกากมัน

สำปะหลัง และเฉพาะ α-amylase (55 IU/g), และ amyloglocosidase (255 IU/g) ในกรณีของแป้งมันสำปะหลัง ในระหว่างการหมักจะสุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมงจนครบ 96 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการหมักและน้ำตาลที่ได้และเหลืออยู่จากการย่อย

แผนผังสรุปการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับการหมักแบบกะในขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122



ศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับการหมักแบบกึ่งกะในขั้นตอนเดียว (simultaneous saccharification and fed-batch fermentation, SSF-fed batch) ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122

ศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับการหมักแบบกึ่งกะในขั้นตอนเดียวจะทดสอบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 L (รูปที่ 2.2) โดยจะใช้ปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้นที่ 1.0 L สำหรับกระบวนการหมักจะเริ่มต้นทำเช่นเดียวกับการหมักแบบกะในการทดลองที่ 13.3.4 แต่หลังจากผ่านไป 16 และ 32 ชั่วโมงจะเริ่ม

เติมสารละลายกากมันสำปะหลัง หรือสารละลายแป้งมัน (ความเข้มข้น 40%, (w/v) พร้อมกับชนิดและความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังหรือสารละลายแป้งมันที่หาได้จากการทดลอง 13.3.4 เพื่อรักษาระดับของแหล่งอาหารคาร์บอนไว้ที่ 20 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักจะสุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือและผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการหมัก

<u>แผนผังสรุปการศึกษาผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับการหมักแบบกึ่งกะในขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122</u>

เตรียมกล้าเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้แรงกวน 100 rpm ในอาหาร AM1 เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 50 g/l, 100 mM bicarbonate และ 1 mM Betaine HCl

▼

ถ่ายกล้าเชื้อ OD_{550} (0.1) พร้อมกับเติมเอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสมลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร

▼

ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะจากการทดลองที่แล้ว แต่หลังจากผ่านไป 18 และ 36 ชั่วโมงจะเริ่มเติมสารละลายกากมันสำปะหลัง (ความเข้มข้น 40%, (w/v) เพื่อรักษาระดับของแหล่งอาหารคาร์บอนไว้ที่ 20 g/L

▼

สุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ทุกๆ 3 ชั่วโมง

รูปที่ 2.2 แสดงถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2L

วิธีการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ตัวอย่างที่ได้ในระหว่างการหมักจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียและส่วนใสก่อนจะนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ทุกตัวอย่างที่ต้องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก จะวัดโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น E520 (Metrohm A.G., Hersau, Switzerland) ที่ผ่านการ calibrated ด้วยบัฟเฟอร์ pH 4.0 และ pH 7.0 ก่อนใช้งานทุกครั้ง

การหาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย

ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักในกรณีที่ใช้น้ำตาลหรือมันสำปะหลังที่ย่อยให้ได้น้ำตาลก่อนนำเข้าสู่กระบวนหมัก จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (SPEKOL 1500, Analytik Jena, Thailand) จากนั้นจะเปลี่ยนค่า OD_{550} ให้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) (1.0 OD_{550} จะเท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรของน้ำหมักโดยประมาณ) ส่วนปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ใช้มันสำปะหลังในการหมักโดยตรงควบคู่กับการย่อยจะวัดปริมาณเซลล์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Moreno et al. (2013) โดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง (LB agar) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะนับจำนวนโคโลนี

ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งและรายงานเป็นจำนวนของโคโลนีที่เกิดขึ้นในหนึ่งมิลลิลิตรของน้ำหมัก (colony forming unit per milliliter of the culture, CFU/ml).

การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก

การหาปริมาณความเข้มของของกรดอินทรีย์ (กรดซักซินิก กรดแลคติก เอทานอล กรดฟอร์มิก และกรดแอซิติก) ที่ได้จากกระบวนการหมักรวมถึงปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการกระบวนการย่อย (น้ำตาลกลูโคส, มอลโทส, ไซโลส, อะราบิโนส, แมนโนส และกาแล็กโทส) จะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) (model 1200 series, agilent technology, Japan) โดยใช้ Detector ชนิด RI (refractive index) ซึ่งน้ำตาลและกรดอินทรีย์จะถูกแยกโดยใช้คอลัมน์ชนิด anion exclusion (BIO RAD, Aminex, HPX-87H, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียสและใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 mM เป็น mobile phase ให้อัตราการไหล 0.4 ml/min ฉีดตัวอย่างครั้งละ10 µL

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแป้งในตัวอย่างจะวิเคราะห์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Tang et al. (2010) โดยการเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างน้ำหมัก 1 mL แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อย่อยแป้งให้กลายเป็นเด็กซ์ตริน ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ หลังจากนั้นเติมสารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ปริมาตร 8,880 µL ก่อนที่จะเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปริมาตร 100 µL แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 mL สุดท้ายนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณปริมาณแป้งตามสมการข้างล่างนี้คือ

ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร) = ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (g/L) X 10^a X 0.9^b

โดยที่ a คือค่าการเจือจางตัวอย่าง และ b คือค่าความสัมพันธ์ของแป้งที่สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส

การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์

ค่าอัตราการผลิตกรดซักซินิกในกระบวนการหมักแบบกะหรือกึ่งกะ (productivity; g/L/h) จะคำนวณโดยใช้ผลรวมของความเข้มข้นของซักซินิกหารด้วยเวลาในการหมักที่ทำให้ได้ปริมาณกรดซักซินิกสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (yield; g product/g sugar consumed) ของกรดซักซินิกนั้น จะคำนวณจากปริมาณความเข้มข้นของกรดซักซินิกหารด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไปเพื่อผลิตกรดซักซินิก

สถานที่ทำการทดลอง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปัจจัยที่เอื้อต่อการวิจัย ระบุเฉพาะปัจจัยที่ต้องการเพิ่มเติม

สิ่งที่ต้องการเพิ่มเติมในโครงการวิจัยนี้คือชุดหมักปฏิมากรณ์ชีวภาพขนาด 2 L และ 500 mL (fleaker) ซึ่งสามารถต่อเข้ากับชุดควบคุมความเป็นกรด และด่างอัตโนมัติ (pH controller) ชุดควบคุมความเร็วของการให้ก๊าซ รวมถึงตัวควบคุมอุณหภูมิ อ่างน้ำวน (water bath)

ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

ผลผลิตที่ได้คือ สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิตสูง ผลผลิต และผลิตผลที่ดีที่สุด โดยใช้แหล่งสารอาหารคาร์บอนราคาถูกคือแป้งมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลัง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปปรับกระบวนการผลิตในระดับการผลิตขนาดใหญ่ต่อไป ผลสำเร็จของงานวิจัยระยะนี้เป็นผลสำเร็จกึ่งกลาง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ผลของการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลชนิดต่างๆ

ในการศึกษานี้ ได้ทดสอบความเป็นได้ของการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 จากน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแล็คโทส และน้ำตาลแมนโนส ที่ความเข้มข้น 30 g/L แยกทดสอบที่ละชนิด ก่อนที่จะทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้น้ำตาลผสมที่ได้จากการย่อยแป้งมันหรือกากมันสำปะหลัง รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถใช้น้ำตาลทุกชนิดที่นำมาทดสอบเพื่อการเจริญสร้างชีวมวล (biomass) และการผลิตซักซิเนต ทั้งนี้พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนตและชีวมวลได้สูงสุด ซึ่งซักซิเนตที่ผลิตได้ (succinate titer) มีความเข้มข้นถึง 27.16 ± 0.35 g/L ให้ค่าผลผลิตได้ (yield) เท่ากับ of 0.89 ± 0.02 g/g และมีความเข้มข้นของชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 2.05 ± 0.07 g/L อย่างไรก็ตามปริมาณซักซิเนต ค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตและปริมาณชีวมวลจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ไม่แตกต่างกันกับการใช้น้ำตาลมอลโทสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพียงแต่การใช้น้ำตาลมอลโทสให้ค่าอัตราการผลิต (productivity) ต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณซักซิเนตต่ำสุดที่ผลิตได้จากเชื้อ *E. coli* KJ122 จะได้จากการใช้น้ำตาลอะราบิโนสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถผลิตซักซิเนตได้เพียง 22.03 ± 0.04 g/L ให้ค่าอัตราการผลิตและค่าผลผลิตได้เท่ากับ 0.83 ± 0.02 g/g และ 0.46 ± 0.00 g/L/h ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) เมื่อพิจารณาถึงช่วงเวลา (time course) ในการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 มีการเจริญตั้งแต่ช่วงก่อน 24 ชั่วโมงของการหมักเมื่อใช้น้ำตาลทุกชนิด ยกเว้นน้ำตาลไซโลส (รูปที่ 1.1) โดยการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เชื้อจุลินทรีย์มีระยะพักตัว (lag phase) ยาวนานกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะเริ่มเจริญและผลิตซักซิเนตหลังจากการหมักผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมง จนผลิตซักซิเนตและชีวมวลได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสได้ความเข้มข้นเท่ากับ 23.23 ± 0.13 g/L ให้ค่าผลผลิตได้เท่ากับ 0.80 ± 0.03 g/g ผลการทดลองดังกล่าวนี้ เหมือนกับที่พบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AFP184 ที่มีการเจริญในน้ำตาลไซโลสในช่วงแรกของการหมักที่ต่ำมาก ต่างกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญที่เร็วมากตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมัก (exponential growth) (Andersson et al., 2007)

เชื้อจุลินทรีย์จะนำเข้าน้ำตาลผ่านโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งสารต่างๆ (transporter proteins) ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ตรงเยื่อหุ้มนิวเคลียส (cytoplasmic membrane) โดยการขนส่งน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* จะเกิดขึ้นผ่าน phosphotransferase system (PTS) โดยใช้ glucose-specific PTS permease $EIICB^{glc}$ ที่ตั้งรหัสยีนว่า *ptsG* (Deutscher et al., 2006) ส่วนการนำเข้าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* จะเกิดขึ้นผ่าน 2 ระบบที่แตกต่างกัน ระบบแรกคือระบบที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า ABC transporter ซึ่งจะเป็นระบบหลักที่ทำหน้าขนส่งน้ำตาลไซโลส โดยกลุ่มโปรตีน ABC transporter เป็นระบบที่ต้องการพลังงานจากการสลาย ATP และโปรตีนในกลุ่มนี้จะมี ATP-binding cassette (บริเวณจำเพาะสำหรับให้ ATP มาจับ) ซึ่งจะถูกตั้งรหัสยีนเป็น *xylF*, *xylG* และ *xylH* ทั้งนี้ *xylFGH* ยีน จะมีความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น

(affinity) สูง โดยมีค่า *Km* ระหว่าง 0.2 และ 4 μM (Sumiya et al., 1995) ทั้งนี้การนำเข้าน้ำตาลไซโลสด้วยระบบนี้ จะต้องการพลังงานหนึ่ง ATP ในการขนส่งน้ำตาลไซโลส 1 โมลล์ (Hasona et al., 2004) ส่วนระบบขนส่งน้ำตาลไซโลสระบบที่สอง คือ ระบบที่อาศัยการทำงานของโปรตรอน (proton/xylose symporter) ที่ตั้งรหัสยีนว่า *xylE* ระบบนี้จะอาศัยพลังงานจากแรงขับเคลื่อนโปรตอน ที่เกิดจากความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตอนของทั้ง 2 ฝั่งของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยระบบ proton/xylose symporter จะมีความสามารถในการจับกับสารที่ค่อนข้างต่ำ มีค่า *Km* ระหว่าง 63 และ 169 μM ทั้งนี้ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* จะต่ำกว่าเกณฑ์ปรกติ เนื่องจากต้องการพลังงานในการนำเข้าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์นั่นเอง เป็นที่น่าประหลาดใจว่าอัตราการใช้น้ำตาลอะราบิโนสของเชื้อ *E. coli* KJ122 จะเร็วกว่าการใช้น้ำตาลไซโลส แม้ว่าระบบขนส่งน้ำตาลอะราบิโนสเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* จะคล้ายคลึงกันกับระบบขนส่งน้ำตาลไซโลสก็ตาม (Sumiya et al., 1995) ซึ่ง Desai and Rao, 2010 ได้อธิบายไว้ว่า เชื้อ *E. coli* สามารถขนส่งน้ำตาลอะราบิโนสได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการขนส่งน้ำตาลไซโลส โดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่ ATP ถูกจำกัด เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์จะเลือกนำเข้าน้ำตาลอะราบิโนส ด้วยระบบ AraE proton symporter ที่มีความสามารถในการจับกับสารที่ต่ำ โดยอาศัยพลังงานจากแรงขับเคลื่อนของโปรตอน มากกว่าระบบ AraFGH ABC transporter ที่มีความสามารถในการจับสูง ซึ่งต่างจากการขนส่งน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* ที่จะเลือกขนส่งน้ำตาลไซโลสด้วยระบบ high-affinity XylFGH tansporter ที่มีความสามารถในการจับสูง สำหรับการขนส่งน้ำตาลแมนโนส (D-mannose) ของเชื้อ *E. coli* นั้น โดยทั่วไปจะขนส่งด้วยระบบ phosphoenolpyruvate (PEP): mannose phosphotransferase system (PTS) คล้ายคลึงกับการขนส่งน้ำตาลกลูโคส โดย mannose-6-phosphate ที่ได้มาจากการย้ายหมู่ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็น fructose-6-phosphate โดยเอนไซม์ mannose-6-phosphate isomerase ที่ย่อด้วยยีน *man* (Markovitz et al., 1967) สำหรับน้ำตาลกาแล็คโทสจะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* ผ่านระบบ β-methylgalactoside permease หรือกลุ่มของโปรตีนในระบบ Mgl ที่ย่อด้วย *mglA*, *mglB* และ *mglC* (Csiszovszki et al., 2011)

องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำประหลังบดแห้งที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งพบว่า แป้งเป็นองค์ประกอบหลักในกากมันสำปะหลังบดแห้ง โดยมีปริมาณถึง 58.74±0.15 **(%, w/w** โดยน้ำหนักแห้ง) Carta et al. (1999) ได้รายงานว่าปรกติแล้วกากมันสำประหลังจะมีแป้งอยู่ประมาณ 50% ฉะนั้นแป้งจึงถือว่าเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในกากมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตามปริมาณแป้งที่พบในกากมันสำปะหลังจะมีความแปรปรวนไม่เท่ากัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันของสายพันธุ์ พื้นที่ที่เพาะปลูก ฤดูการที่เก็บเกี่ยว ตลอดจนขั้นตอนและวิธีการเก็บเกี่ยวด้วย (Sriroth et al., 2000; Pandey et al., 2000) ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วแป้งจะประกอบไปด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bonds) โดยน้ำตาลกลูโคสในโครงสร้างของอะไมโลสจะเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 และน้ำตาลกลูโคสในอะไมโลเพกตินจะเชื่อมต่อกันทั้งตำแหน่งแอลฟา 1,4 และแอลฟา 1,6 อาจกล่าวได้ว่าแป้งเป็นอีกหนึ่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพที่จะใช้ในการผลิตสารเคมีต่างๆ ด้วยกระบวนการหมัก รวมไปถึงการผลิตซักซิเนตด้วย

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลชนิดต่างๆ[A]

Sugars	Residual sugar (g/L)	Products			Succinate yield (g/g)[B]	Succinate productivity (g/L/h)[C]
		Succinate (g/L)	Acetate (g/L)	Biomass (g/L)		
Glucose	0.00±0.00^{e}	27.16±0.35^{a}	3.13±0.16^{b}	2.05±0.07^{a}	0.89±0.02^{ab}	0.57±0.01^{a}
Maltose	0.92±0.01^{d}	27.07±0.08^{a}	3.75±0.87^{ab}	1.94±0.08^{abc}	0.92±0.01^{a}	0.51±0.00^{b}
Arabinose	4.03±0.82^{a}	22.03±0.04^{e}	3.14±0.10^{b}	1.75±0.20^{abc}	0.83±0.02^{cd}	0.40±0.00^{d}
Xylose	1.61±2.63^{c}	23.23±0.13^{d}	3.78±0.60^{ab}	1.71±0.18^{abc}	0.80±0.03^{d}	0.24±0.00^{f}
Galactose	2.50±0.57^{b}	23.97±0.52^{c}	3.78±0.19^{ab}	1.51±0.35^{c}	0.80±0.03^{d}	0.46±0.01^{c}
Mannose	2.47±2.47^{b}	22.74±0.17^{d}	3.18±0.18^{b}	1.58±0.12^{bc}	0.82±0.00^{cd}	0.30±0.01^{e}

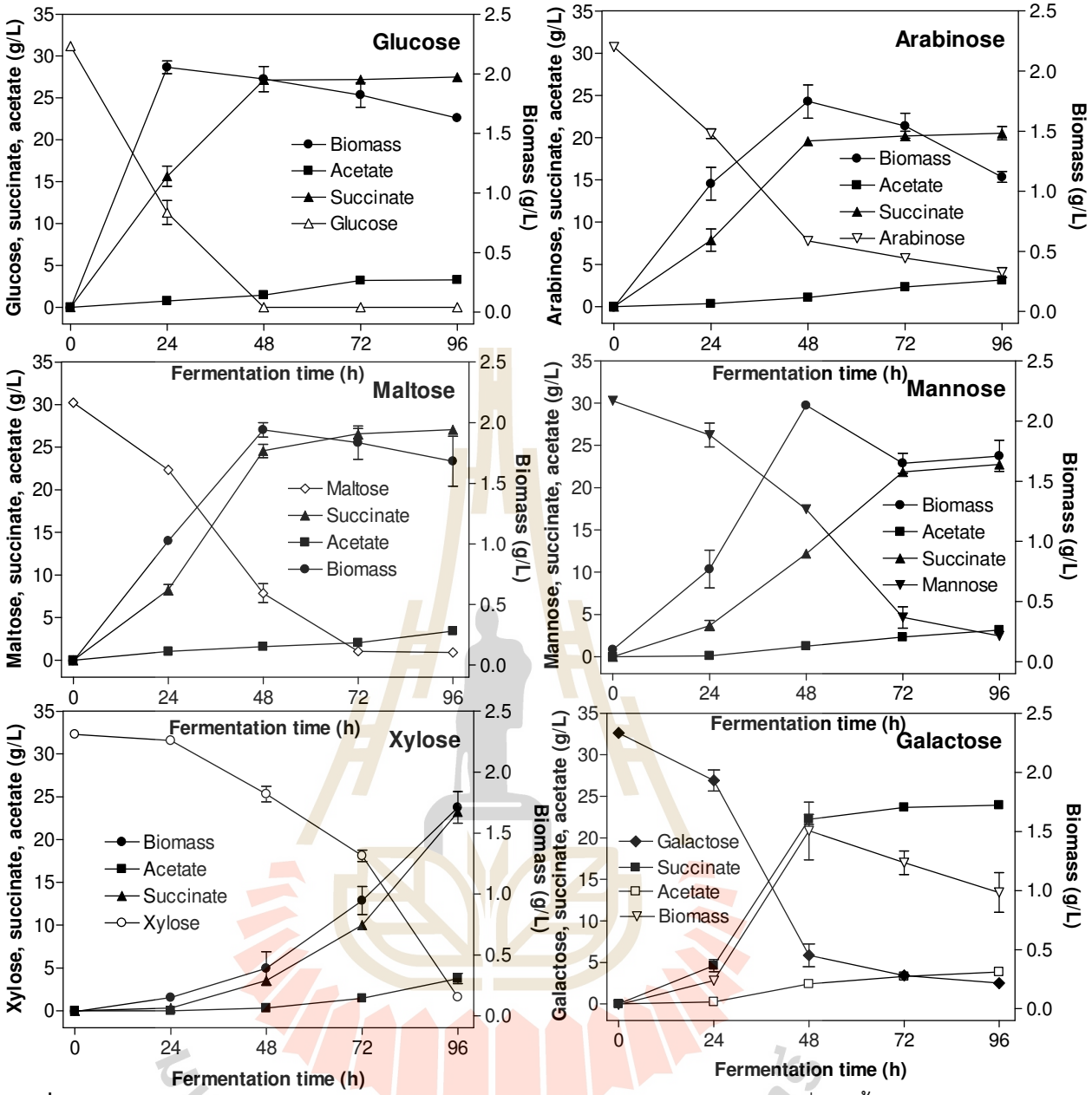
[A]Fermentations were performed in small anaerobic bottles for 96 h with various carbon sources at initial concentration of 30 g/L supplemented with AM1 medium.

[B]Succinate productivity was calculated as the maximum concentration of succinate in the medium divided by the time reached the peak value.

[C]The succinate yield was calculated as grams of succinate formed divided by grams of the sugars consumed.

[a-e]Mean values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.1 ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (500-mL) และใช้น้ำตาลเริ่มต้น 30 g/L ที่เสริมในอาหาร AM1

ปริมาณเส้นใย (14.08±0.03%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) พบเป็นอันดับสองในกากมันสำปะหลังบดแห้ง (ตารางที่ 3.2) โดยเส้นใยจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Rattanachomsri et al., 2009) ซึ่งเมื่อเส้นใยถูกย่อยด้วยกระบวนทางเคมี หรือย่อยด้วยเอนไซม์ก็จะปลดปล่อยน้ำตาลจำพวกกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนโนสและกาแลคโทสออกมา และน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการย่อยเส้นใยในกากมันสำปะหลังเหล่านี้สามารถใช้เป็นสารแหล่งอาหารสำหรับเชื้อ *E. coli* KJ122 ในการผลิตซักซิเนตได้ นอกจากนี้กากมันสำปะหลังบดแห้งยังประกอบไปด้วยไขมัน (0.41±0.01%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) โปรตีน (1.77±0.23%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) และเถ้า (1.87±0.03%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) Pandey et al. (2000) อีกด้วย ปริมาณเถ้าที่ค่อนข้างต่ำในกากมันสำปะหลังเป็นประโยชน์ต่อการนำเอาไปใช้ทางกระบวนการทางชีวภาพหรือกระบวนการหมัก

ในทางตรงกันข้ามพืชชีวมวลอื่นๆ เช่น ฟางข้าว (17.5%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) ซังข้าวสาลี (11.0%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) กากต้นเรพซีด (7.1%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง) มีปริมาณเถ้าค่อนข้างสูง (Pandey et al., 2000; Thanaseelaan, 2013) โดยอาจจะอนุมานได้ว่าพืชชีวมวลที่มีปริมาณเถ้าสูง จะมีสัดส่วนของสารชีวมวลที่จะสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมักได้น้อยกว่าพืชชีวมวลที่มีปริมาณเถ้าน้อยกว่า เมื่อนำพืชชีวมวลที่มีปริมาณเถ้าสูงไปใช้ในการผลิตซักซิเนต ก็จะส่งผลให้ได้ปริมาณซักซิเนตที่ต่ำกว่าด้วย

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบทางเคมี	**(%, w/w โดยน้ำหนักแห้ง)**
ไขมัน	0.41±0.01
โปรตีน	1.77±0.23
เถ้า	1.87±0.03
เส้นใย	14.08±0.03
ความชื้น	7.56±0.13
คาร์โบไฮเดรต	74.31±0.24
ปริมาณแป้ง (วิเคราะห์ด้วยวิธีย่อยด้วยเอนไซม์)	58.74±0.15

ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายกากมันสำปะหลังแห้งบดที่ผ่านกระบวนการย่อย (hydrolysate)

รูปที่ 3.2A แสดงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายกากมันสำปะหลังแห้งบดที่ผ่านกระบวนการย่อย (ไฮโดรไลเซต; hydrolysate) ด้วยกรดอินทรีย์และเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่าน้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส ไซโลส และอะราบิโนส สามารถตรวจพบได้ทั้งไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางและเอนไซม์ชนิดต่างๆ การใช้เอนไซม์อะไมเลส (amylase; Amy) หรือเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase; AMG) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ ในการย่อยอะไมโลสและอะไมโลเพกทินที่เป็นโครงสร้างหลักในแป้ง เพื่อย่อยกากมันสำปะหลังนั้น ไฮโดรไลเซตที่ย่อยได้จะมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ทั้งนี้เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีแป้งอยู่ในปริมาณมากนั่นเอง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ Amy หรือ AMG ได้ประมาณ 60.50% (w/w, โดยน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ Amy และ AMG ร่วมกันในการย่อยกากมันสำปะหลัง ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ย่อยได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (65.21±0.12% w/w, โดยน้ำหนักแห้ง) ในทำนองตรงกันข้ามการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ (cellulase complex; Cel) หรือ เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase; Xyl) หรือการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนร่วมกับเอนไซม์ไซลาเนส (Cel+Xyl) ได้น้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นหลัก โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ในช่วง 12.77 ถึง 39.50% (w/w, โดยน้ำหนักแห้ง) ซึ่งสามารถอธิบายได้จากเอนไซม์ เซลลูเลสคอมเพล็กซ์และเอนไซม์ไซลาเนสจัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย (activity) เฉพาะกลุ่มที่ไม่ใช่โพลีแซ็คคาไลด์เท่านั้น (non polysaccharide hydrolyzing activity) โดยเอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ และเอนไซม์ไซลาเนสจะเข้าย่อยโมเลกุลของกลูโคสที่ตำแหน่งบีต้า 1,4 (β-1,4 D-glucose) และเข้าย่อยโมเลกุลของไซโลสที่ตำแหน่งบีต้า 1,4 (β-1,4 D-xylose) ในโครางสร้างของเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) ที่พบในส่วนเส้นใยของกากมันสำปะหลัง ซึ่งผลจากการย่อยที่

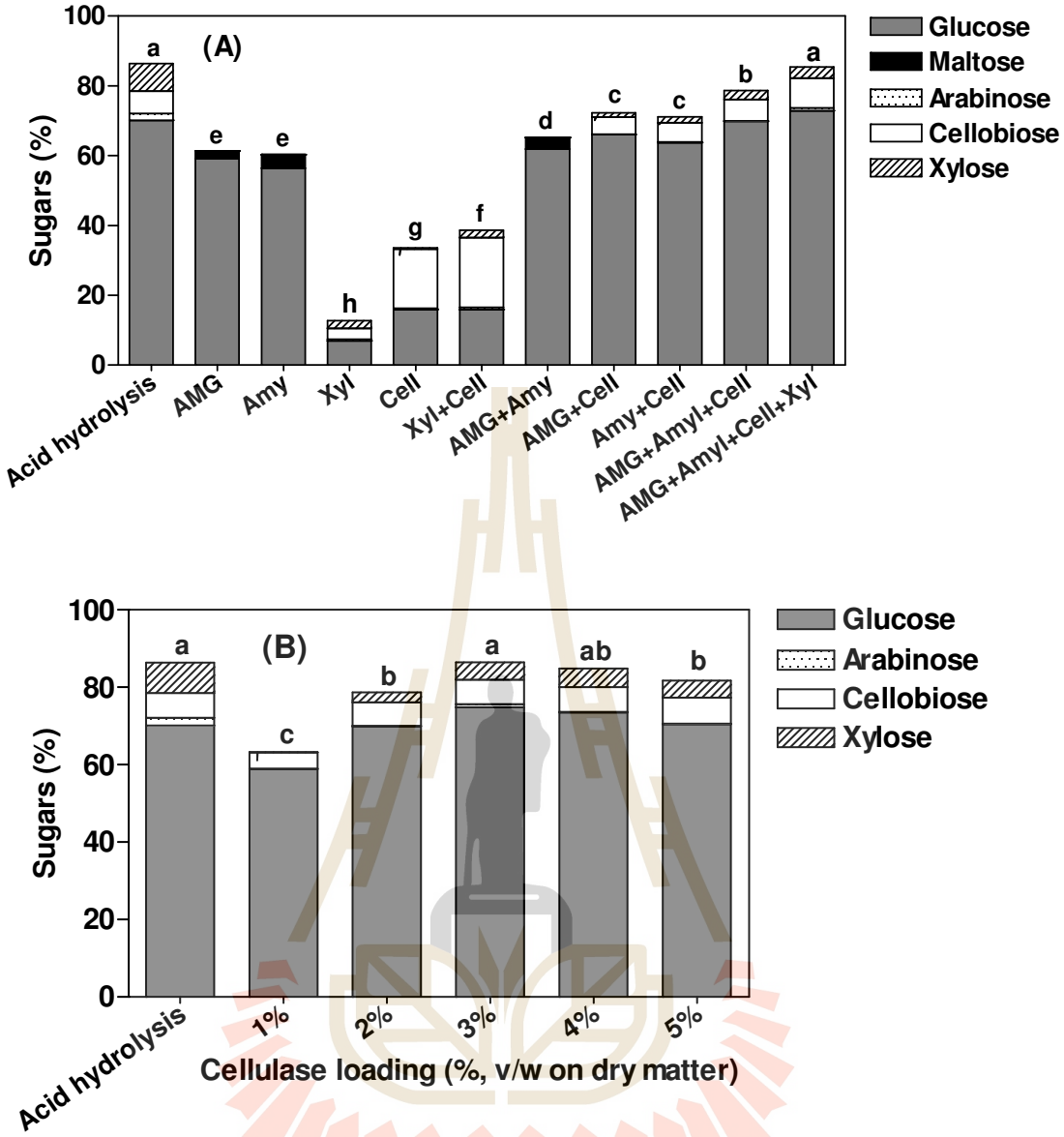
ตำแหน่งดังกล่าวทำให้ได้น้ำตาลเซลโลไบโอส และน้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก พร้อมทั้งยังปลดปล่อยน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลมอลโทสอีกบางส่วนด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongchul et al. (2010) ที่พบว่าน้ำตาลเซลโลไบโอสสามารถพบได้เป็นปรกติในไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลัง ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว แต่ทว่าได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหลังจากการย่อยที่ค่อยข้างต่ำ (0.25 g/g น้ำหนักแห้ง) น้อยกว่า 50% ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่สามารถจะย่อยกากมันสำปะหลังได้ในทางทฤษฎี นอกจากนี้ Rattanachomsri et al. (2009) ได้รายงานว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือไซลาเนส หรือโพลีกาแล็คทูโรเนส (polygalacturonase) เพียงอย่างเดี่ยวอย่างใดอย่างหนึ่งในการย่อยกากมันสำปะหลัง จะสามารถย่อยได้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ตัวอื่นๆ ในปริมาณที่ต่ำมาก นั่นแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของน้ำตาลที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing sugars) และโอลิโกแซ็กคาไลด์ (Oligosaccharides) ยังคงหลงเหลืออยู่ในไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังเมื่อใช้แค่เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโครงสร้างที่ไม่ใช่แป้งเท่านั้น

สำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยอะไมโลสในโมเลกุลของแป้ง (starch degrading amylotytic enzymes) เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amy) และเอนไซม์อะไมโลกูโคซิเดส (AMG) พบว่า ไม่ว่าจะเป็นการใช้ Amy หรือ AMG เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือการใช้ Amy และ AMG ร่วมกัน สามารถย่อยกากมันสำปะหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รูปที่ 3.2A) ทั้งนี้ Amy และ AMG จะเจาะจงย่อยโมเลกุลแป้งที่กลูโคสตำแหน่งแอลฟา 1,4 (α-1,4 D-glucose) และแอลฟา 1,6 (α -1,6 D-glucose) เท่านั้น จะไม่ย่อยพอลิแซ็คคาไรด์ชนิดอื่น ในกากมันสำปะหลังเลย ฉะนั้นเมื่อย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนมากและมีน้ำตาลมอลโทสเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เอนไซม์ Cel หรือ Xyl หรือ Cel + Xyl ร่วมกันกับ Amy และ AMG จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยและเพิ่มปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugars) หลังการย่อยได้อย่างมาก การเติมเอนไซม์ Cel และ Xyl จะช่วยย่อยโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มมากขึ้นเป็น 85.50 ± 0.69% (w/w, โดยน้ำหนักแห้ง) ซึ่งเทียบเท่ากับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางเลยทีเดียว (86.36 ± 0.18% (w/w, โดยน้ำหนักแห้ง) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ Cel และ Xyl ร่วมกันกับเอนไซม์ Amy และ AMG ในการย่อยกากมันสำปะหลังนั้น การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ Cel และ Xyl ในการย่อยโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยของเอนไซม์ Amy และ AMG ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ Cel และ Amy หรือ Cel และ AMG จะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลหลังจากการย่อยได้ Zhu et al. (2012) ได้รายงานว่า เมื่อใช้เอนไซม์ร่วมกันระหว่าง Cel, Amy และ AMG ในการย่อยกากมันสำปะหลังจะทำให้ได้ค่าผลได้ของน้ำตาลหลังการย่อยสูงที่สุด (highest sugar yield) มากกว่า 0.46 g/g น้ำหนักแห้ง แต่เมื่อใช้เฉพาะเอนไซม์ Amy หรือ AMG อย่างใดอย่างหนึ่งในการย่อยกากมันสำปะหลัง จะได้ค่าผลได้ของน้ำตาลหลังการย่อยในช่วง 0.2 ถึง 0.28 g/g น้ำหนักแห้งเท่านั้น เช่นเดียวกับในรายงานของ Ratanachomsri et al. (2009) ที่กล่าวว่าการใช้เอนไซม์เพกติเนส (pectinase) และบีต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) ร่วมกับเอนไซม์ Cel และกลุ่มเอนไซม์ RSD ที่มีความจำเพาะในการย่อยอะไมโลสในโมเลกุลของแป้ง ในระหว่างทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์โดยไม่ใช้ความร้อน (non-thermal enzymatic saccharification) จะสามารถย่อยน้ำตาลได้สูงที่สุดมากถึง 0.57 g/g น้ำหนักแห้ง

เนื่องจากในเอนไซม์ Cel ที่ใช้ในการศึกษานี้มีเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เช่น เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase; Xyl) รวมอยู่ด้วยเล็กน้อย จึงเกิดข้อสันนิฐานว่าถ้าเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ Cel ที่ใช้ก็อาจเพิ่มปริมาณของ Xyl ด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจจะทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้ Xyl จาก

แหล่งภายนอกเพิ่มอีกเลย และจากรูปที่ 1.2A พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ AMG และ Cel หรือ Amy และ Cel ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังการย่อยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จนอาจกล่าวได้ว่าการใช้เอนไซม์ AMG หรือ Amy ร่วมกับเอนไซม์ Cel ในการย่อยกากมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน ฉะนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ Cel ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (1, 2, 3, 4 และ 5% v/w ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ AMG ความเข้มข้น 2% (v/w ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง) ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังจากการย่อยเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของ Cel มากกว่า 3% ขึ้นไป อย่างไรก็ตามการใช้ความเข้มของของเอนไซม์ Cel มากกว่า 3% ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังจากการย่อยลดลงเล็กน้อย และการใช้เอนไซม์ Cel ในปริมาณ 3% ร่วมกับการใช้ AMG 2% เป็นสภาวะที่ได้น้ำตาลทั้งหมดหลังการย่อยมากที่สุด (86.48±0.18% w/w ต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง) ซึ่งเทียบเท่ากับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง (86.36±0.18% w/w ต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง) หรือการใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง Amy + AMG + Cel + Xyl (85.48±0.69% w/w ต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง) (รูปที่ 1.2B) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ผลขัดแย้งกับรายงานของ Thongchul et al. (2010) ที่กล่าวว่า การใช้กรดเจือจางสามารถย่อยกากมันสำปะหลังได้ค่าผลได้น้ำตาล (sugar yield) มากกว่า 85% และมากกว่าค่าผลได้น้ำตาลสูงที่สุดที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามด้วยเอนไซม์ Amy เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ AMG ต่ออีก 3 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าผลได้น้ำตาลเพียงแค่ 40.7% เท่านั้น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากากมันสำปะหลังจะย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้เอนไซม์ทั้งที่มีความจำเพาะในการย่อยแป้งและเอนไซม์ที่สามารถย่อยโครงสร้างเส้นใยที่ไม่ใช่แป้งร่วมกันระหว่างเอนไซม์ Cel ในปริมาณ 3% v/w ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง (มีความสามารถในการย่อย (activity) endoglucanase; 56 CMC-U/g น้ำหนักแห้ง และ β-glucosidase; 15 pNG-U/g น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 1.3) และ AMG ในปริมาณ 2% v/w ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง โดยสรุปแล้วสามารถกล่าวได้ว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในสภาวะที่ได้จากกการศึกษานี้ เป็นสภาวะที่ดีกว่าการศึกษาที่ผ่านมาอย่างมาก ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ใช้กากมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลกติกและเอทานอล (Thongchul et al., 2010; Ratanachomsri et al., 2009 และ Zhu et a., 2012)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.2 องค์ประกอบของไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังที่ได้หลังจากการย่อย (A) ผลของการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในการย่อยกากมันสำปะหลัง (B) ผลของปริมาณการใช้ Cel ร่วมกับ AMG ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อย่อยกากมันสำปะหลัง โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ AMG จะควบคุมให้คงที่ที่ 2% (v/w, ต่อน้ำหนักแห้ง), ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-h) แสดงความแตกของค่าเฉลี่ยทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), AMG, Amy, Xyl และ Cel เป็นตัวย่อของเอนไซม์อะไมโลกูโคสิเดส อะไมเลส ไซลาเนสและเซลลูเลส ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ระหว่างการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ

Enzymes	Enzymes activity					Total sugars (%, w/w on dry basis)
	Amy (IU/g)	AMG (IU/g)	Xyl (CMC-U/g)	Cel[A] (CMC-U/g)	B (CMC-U/g)	
Amy	562	–*	–	–	–	60.26±0.74[e]
AMG	–	284	–	–	–	61.39±0.34[e]
Xyl	–	–	52	–	–	12.66±1.18[h]
Cel	–	–	–	37	10	33.60±0.64[g]
Amy+AMG	562	284	–	–	–	65.21±0.12[d]
Amy+Cel	562	–	–	37	10	71.08±0.66[c]
AMG+Cel	562	284	–	37	10	72.27±0.24[c]
Cel+Xyl	–	–	52	37	10	38.73±1.30[f]
Amy+AMG+Cel	562	284	–	37	10	78.69±1.04[b]
Amy+AMG+Cel+Xyl	562	284	52	37	10	85.48±0.69[a]
Acid hydrolysis**	–	–	–	–	–	86.36±0.18[a]

- Hydrolysis was conducted at 40°C at an initial pH of 6.0 with shaking at 200 rpm for 48 h with 10% (w/w) cassava pulp.

[A]Cellulase complex contains endoglucanase and β-glucosidase activity and minor xylanase activity. All enzymes used were fixed at 2% (v/w, on dry matter).

*–, not added. AMG, Amy, Xyl, Cel, and B stand for amyloglucosidase, α-amylase, xylanase, cellulase complex, and β-glucosidase, respectively.

**Acid hydrolysis reaction contained 10% (w/w) cassava pulp in 1M HCl and heated at 121°C for 15 min. Lower case letters (a-h) represent a significant difference between mean value of treatments ($p<0.05$).

การผลิตซักซิเนตด้วยวิธีการย่อยกากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาล ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก (separate hydrolysis and fermentation, SHF)

เชื้อ *E. coli* KJ122 ไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตซักซิเนตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) ให้เป็นกลางด้วยสารจำพวกด่าง (alkaline) เพียงอย่างเดียว (ข้อมูลไม่ได้แสดง) อาจเนื่องจากว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางนั้นทำให้เกิดสารพลอยได้ (by products) ที่ไม่ต้องการ เช่น อนุพันธุ์ของเฟอฟูรอล (furfural derivatives) กรดอินทรีย์ต่างๆ (organic acids) และสารประกอบฟีโนลิกต่างๆ (phenolic compounds) Cantarella et al. (2004) ได้รายงานว่าไฮโดรไลเซตที่เตรียมจากการย่อยด้วยกรดจะต้องทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางด้วยสารจำพวกด่างก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก ทั้งนี้ความเข้มข้นมากๆ ของเกลือที่เกิดขึ้นหลังจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของไฮโดรไลเซต รวมทั้งสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ (other inhibitory byproducts) อาจเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก และยับยั้งกระบวนการหมักได้

ฉะนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (without pretreatment) ที่เตรียมด้วยวิธีย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนทางเลือกในการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122

ในการทดลองนี้จะใช้ไฮโดรไลเซตจากกากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด (total initial sugars) เท่ากับ 50 g/L เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเพื่อการผลิตซักซิเนต นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลผสมที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic sugars mixture) เหมือนกับน้ำตาลที่พบในไฮโดรไลเซตจากกากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ (การทดลองชุดควบคุม) ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถใช้น้ำตาลในไฮโดรไลเซตจากกากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์และน้ำตาลผสมที่สังเคราะห์ขึ้น ไปพร้อมกับการผลิตซักซิเนตในสภาวะการหมักแบบไร้อากาศได้ (anaerobic condition) (รูปที่ 3.3 และ ตารางที่ 3.4) ซึ่งความเข้มข้นของซักซิเนตที่ได้จากการใช้น้ำตาลจากกากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ และน้ำตาลผสมสังเคราะห์เท่ากับ 40.73±0.23 และ 41.46±0.05 g/L ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าผลได้เท่ากับ 0.84±0.01 และ 0.82±0.01 g/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าการใช้น้ำตาลทั้งสองชนิดข้างต้นให้ค่าอัตราการผลิตซักซิเนต (succinate productivity) ที่เท่ากันอยู่ที่ 0.84 g/L/h นอกจากนี้ค่าผลได้และค่าอัตราการผลิตซักซิเนตที่สูงที่สุดในการศึกษานี้ ยังเทียบเท่ากันกับการศึกษาของ Jantama et al. (2008) ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียวในการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 นอกจากนี้ Zheng et al. (2009) ได้ศึกษาการผลิตซักซิเนตจากซังข้าวโพด (corn straw) ด้วยเชื้อ *A. succinogenes* CGMCC1593 โดยใช้วิธีการย่อยควบคู่ไปกับการหมัก (simultaneous succharification and fermentation; SFF) ทั้งการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ พบว่าสามารถผลิตซักซิเนตได้ความเข้มข้นในช่วง 45 ถึง 53 g/L ให้ค่าผลผลิตได้เท่ากับ 80.4 ถึง 82.5 g ต่อตัวอย่างซังข้าวโพด 100 g ต่อมา Wang et al. (2011) ได้ศึกษาการใช้ต้นข้าวโพด (corn stalk) ในผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SHF แบบกะ (batch SHF) ด้วยเชื้อ *E. coli* SD121 สามารถผลิตซักซิเนตได้ถึง 57 g/L ได้ค่าผลได้เท่ากับ 87 (g/100 g ต้นข้าวโพด) ในปีต่อมา Jiang et al. (2014) สามารถผลิตซักซิเนตจากลำต้นข้าวโพดได้ความเข้มข้น 21.1 g/L ได้ค่าผลผลิตเท่ากับ 76 (g/100 g ต้นข้าวโพด) โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SHF ด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DC115 จากการผลทดลองนี้สรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนตได้เทียบเท่ากับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่รายงานการผลิตซักซิเนตจากวัตถุดิบที่เป็นของเสียจากภาคเกษตรกรรม (agricultural waste products) ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ทุกรายงานระบุว่าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบอุดมสมบูรณ์ (rich medium) ในการเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ได้ค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่าการศึกษานี้เล็กน้อย ทว่าการใช้อาหารแบบอุดมสมบูรณ์ในการเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นการเพิ่มภาระค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต ความซับซ้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อยังส่งผลต่อความยุ่งยากในขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ (purification) ซึ่งส่งผลให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในกระบวนแยกสาร (separation) และเพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิตโดยรวมด้วย

หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส ถูกใช้ไปจนหมด และผลิตซักซิเนตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมักด้วย ทั้งนี้ความเข้มเข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้นี้ยังคงคงที่ไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากรูปที่ 3.3 จะเห็นว่าน้ำตาลไซโลส และอะราบิโนสถูกใช้ไปพร้อมๆ กันกับการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยไม่มีกลไกการยับยั้ง (catabolite repression) โดยทั่วไปแล้ว น้ำตาลไซโลสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* ด้วยระบบที่ต้องอาศัย ATP เข้ามาเกี่ยวข้อง ที่เรียกว่า ATP-dependent xylose-ABC transporter ส่วนน้ำตาลอะราบิโนสจะนำเข้าสู่เซลล์ด้วยระบบที่อาศัยโปรตรอน ที่เรียกว่า H^+ symporter ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน

(expression level) ที่ทำหน้าที่ในการนำเข้าทั้งน้ำตาลไซโลสและอะราบิโนสจะถูกควบคุมภายใต้กลไกการยับยั้ง (catabolite repression mechanism) Zhang et al. (2009) รายงานว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ระบบ PTS ซึ่งเป็นระบบการนำเข้าน้ำตาลโดยปรกติทำให้เพิ่มระดับการแสดงออกของอะดินิเลท ไซเคลส (adenylate cyclase) และโปรตีน CRP (cAMP-receptor protein) เป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น (parental strain; *E. coli* ATCC8739) ทั้งนี้การเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน cAMP-CRP สามารถเป็นเหตุให้การนำเข้าน้ำตาลกลูโคสด้วยระบบ PTS หยุดการทำงาน (inactivation) ส่งผลให้กลไกการยับยั้งการนำเข้าน้ำตาลตัวอื่นๆ เมื่อมีน้ำตาลกลูโคสในระบบ (de-repressing a catabolite repression) หยุดชะงักไป ทำให้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 สามารถใช้น้ำตาลอื่นๆ เช่น อะราบิโนส และไซโลสไปพร้อมๆ กันกับน้ำตาลกลูโคสได้ Andersson et al. (2007) พบว่า เชื้อ *E. coli* AFP184 ที่เป็นเชื้อกลายพันธุ์ที่ระบบการนำเข้าน้ำตาล PTS และมีผลต่อปริมาณ $EIIB^{glu}$ ทำให้สามารถสันดาปน้ำตาลไซโลสควบคู่กับน้ำกลูโคสในอัตราที่เร็วกว่า ถ้าระบบมีเพียงแค่น้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียว ซึ่งค่าอัตราการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AFP184 จากการใช้น้ำตาลผสมระหว่างกลูโคส/ไซโลส จะสูงกว่าการใช้น้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียวอีกด้วย นอกจากนี้ Jiang et al. (2014) ได้รายงานว่า เชื้อ *E. coli* DC115 ซึ่งเป็นเชื้อที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมจากเชื้อ *E. coli* AFP184 ให้สามารถผลิตซักซิเนตเป็นหลัก เชื้อดังกล่าวสามารถลำเลียงน้ำตาลกลูโคสและอะราบิโนสเข้าสู่เซลล์ได้พร้อมๆ กัน และจะเริ่มใช้น้ำตาลไซโลสก็ต่อเมื่อน้ำตาลกลูโคสและอะราบิโนสถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์หมดแล้วเท่านั้น กระนั้นยังพบว่าการสันดาปน้ำตาลไซโลสควบคู่กับกลูโคส (co-metabolism) จะเกิดขึ้นเมื่อน้ำตาลอะราบิโนสถูกใช้ไปจนหมดแล้ว

เชื้อ *E. coli* KJ122 ไม่สามารถใช้น้ำตาลเซลโลไบโอส (cellobiose) ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งต่างกับการใช้กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส ที่เชื้อสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าแม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการหมักนานถึง 96 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ยังคงไม่สามารถใช้เซลโลไบโอสพร้อมกันกับ (co-utilize) น้ำตาลชนิดอื่นได้ แต่จะเริ่มใช้เซลโลไบโอสหลังจากที่น้ำตาลชนิดอื่นถูกใช้ไปหมดแล้ว นอกจากนี้ อัตราในการใช้เซลโลไบโอสของเชื้อจุลินทรีย์ยังมีค่าต่ำมาก โดยเซลโลไบโอสถูกใช้ไปประมาณ 50% เท่านั้น (รูปที่ 3.3) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Gokarn et al. (1997) ที่ทำการผลิตซักซิเนตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง (anaerobic ruminal bacteria) 2 ชนิด คือ *Fibrobactor succinogenes* S85 และ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 จากผลการทดลองพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการนำเซลโลไบโอสไปใช้ในอัตราที่ต่ำกว่าการใช้น้ำกลูโคส โดยค่าอัตราผลผลิตของซักซิเนตที่ผลิตได้จากการใช้น้ำตาลเซลโลไบโอสมีค่าสูงสุดเพียง 9 mg/L/h ในขณะที่ค่าอัตราการผลิตซักซิเนตจากการน้ำตาลกลูโคสมีค่าสูงถึง 60 mg/L/h ทั้งนี้อัตราในการใช้เซลโลไบโอสที่ต่ำของเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ อาจสามารถอธิบายด้วยกลไกที่ค่อนข้างซับซ้อน (cryptic mechanism) ของยีน *ascFB* (ย่อมาจากของ phosphotransferase system II และ phosphor-β-glucosidase ตามลำดับ) และ *chb* operon (ย่อมาจาก chitobiose/cellobiose-PTS permease) ที่พบได้ทั่วไปในเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันกับ *E. coli* ด้วย Ishida et al. (2009) ได้รายงานว่า β-glucoside metabolic operon คือ ความลึกลับซับซ้อน (cryptic) ของกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันสารพิษในกลุ่ม β-glucosides ที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น น้ำตาลเซลโลไบโอส อาร์บูทิน (arbutin) และ ซาลิซิน (salicin) เป็นต้น

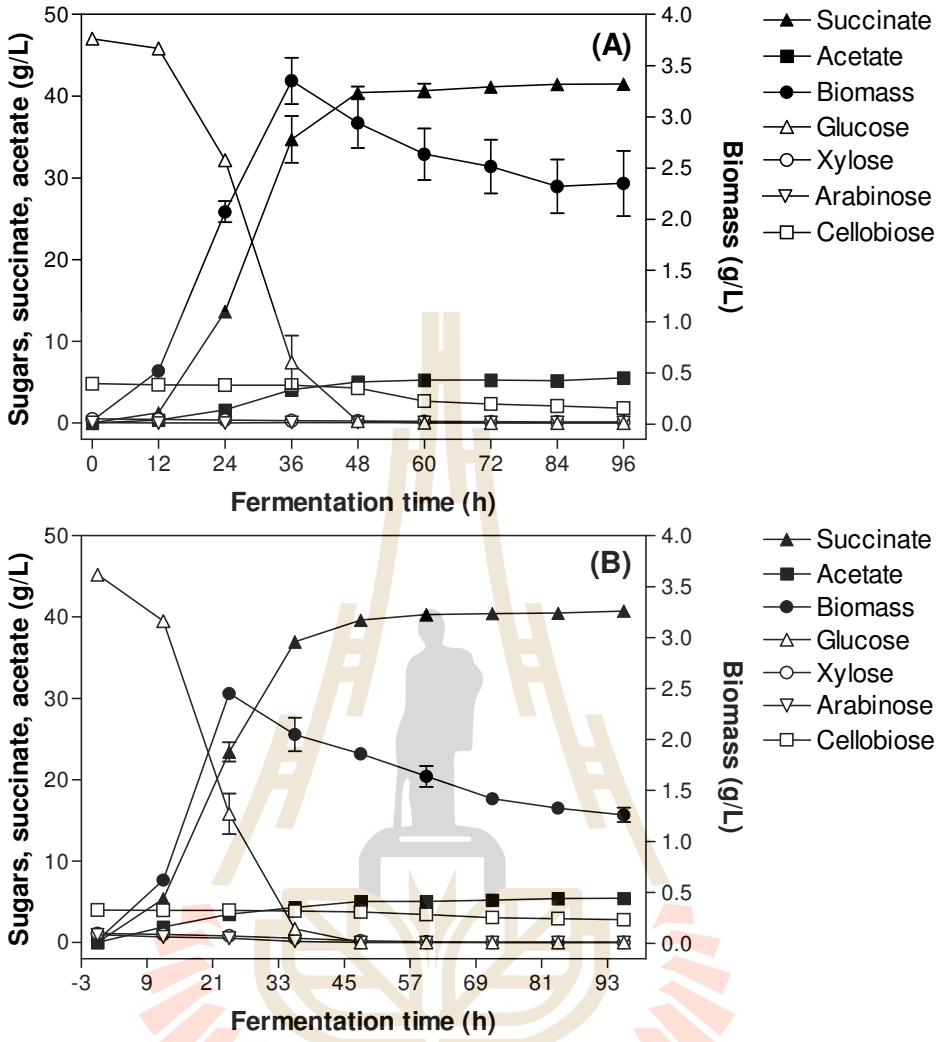
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* KJ122 จากไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการผลิตชีวมวลได้สูงสุดถึง 3.35 g/L และส่งผลทำ

ให้ระยะเวลาในการหมักของเชื้อสายพันธุ์นี้ที่มีช่วงการเจริญเติบโตแบบชี้กำลัง (exponential growth) นานออกไปถึง 36 ชั่วโมง แต่ในขณะที่การใช้น้ำตาลผสมสังเคราะห์ (synthetic sugar mixture) กลับทำให้การเจริญเติบโตแบบชี้กำลังของเชื้อ *E. coli* KJ122 สิ้นสุดลงหลังจากระยะเวลาในการหมักเพียง 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3.3) โดยจะเห็นได้ว่าสารชีวมวลที่ผลิตได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรไลเซตของกากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมมีปริมาณสูงกว่าอาหารที่มีน้ำตาลผสมสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบถึง 1.4 เท่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากากมันสำปะหลังมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งถือเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่ม (extra nitrogen source) (ตารางที่ 1.2) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* KJ122 นอกจากนี้ ในกากมันสำปะหลังยังอาจประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ วิตามิน แร่ธาตุ และสารที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆ ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการผลิตซักซิเนต เช่น *A. succinogenes*, *Anaerospirillum succinoproducens*, และ *F. succinogenes* มักต้องการสารอาหารพิเศษที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตซักซิเนต (Liu et al., 2008) ทั้งนี้ Chen et al. 2011 และ Leung et al. 2012 ต่างก็นำเสนอวิธีการผลิตซักซิเนตจากการใช้ไฮโดรไลเซตที่ได้จากกากเรพซีดและของเสียจากอุตสาหกรรมขนมปังตามลำดับ พวกเขาแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนที่มีไนโตรเจนอิสระ (free amino nitrogen : FAN) เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในไฮโดรไลเซตของกากเรพซีดและของเสียจากอุตสาหกรรมขนมปังประมาณ 200-500 mg/L มีความจำเป็นต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. succinogenes* จากงานวิจัยทั้งสอง ชี้ให้เห็นว่าของเสียจากอุตสาหกรรมขนมปังและกากเรพซีดสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นทดแทนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตซักซิเนตโดยปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนเสริม เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ อาจอนุมานได้ว่าสามารถนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตซักซิเนตทดแทนการใช้สารที่มีเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอื่นๆ เพื่อกระตุ้นการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตซักซิเนตชนิดอื่นๆ ได้

ตารางที่ 3.4 ค่าต่างๆ ที่ได้จากการหมักแบบ SHF ของเชื้อ *E. coli* KJ122 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

Kinetic parameters	Model sugars mixture	Enzymatic cassava pulp
Glucose residual (g/L)	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
Xylose residual (g/L)	0.00±0.00[a]	0.15±0.01[a]
Arabinose residual (g/L)	0.00±0.00[b]	0.08±0.00[a]
Cellobiose residual (g/L)	2.79±0.15[a]	1.88±0.05[b]
Succinate (g/L)	40.73±0.23[a]	41.46±0.05[a]
Acetate (g/L)	5.54±0.18[a]	5.55±0.25[a]
Maximum biomass	2.45±0.01[b]	3.35±0.32[a]
Succinate yield (g/g)	0.84±0.01[a]	0.82±000[a]
Succinate productivity (g/L/h)	0.42±0.00[a]	0.43±0.00[a]

All data represent the averages of at least two fermentations with standard deviations. [(a-b)] The values with different symbols in the same row are significantly different ($p<0.05$).



รูปที่ 3.3 ช่วงเวลาของการผลิตซักซิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบ SHF ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (500-mL) ใช้อาหาร AM1 ที่เสริมด้วยน้ำตาลเริ่มต้น 50 g/L

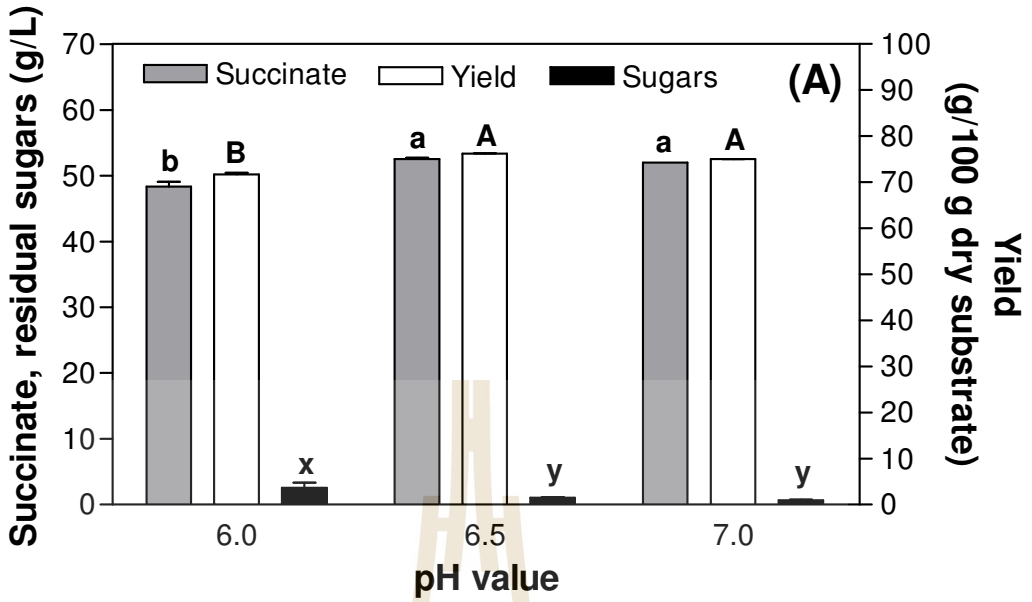
(A) การผลิตซักซิเนตจากไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

(B) การผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลผสมสังเคราะห์

การผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการย่อยและการหมักในขั้นตอนเดียว

ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

โดยปกติแล้วค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีค่าต่ำกว่า 6.0 จะมีผลกระทบทั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลของเอนไซม์ ดังนั้น จึงไม่สามารถทำการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ในระหว่างกระบวนการ SSF ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำมากเกินจนเทียบเท่ากับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยเฉพาะเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 5.0 นี่จึงเป็นเหตุให้ทำการศึกษาผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF จากผลการทดลองพบว่า ซักซิเนตที่ผลิตได้จากสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 มีค่าความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 52.54±0.16 g/L พร้อมทั้งมีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 76.19±0.08 g/100 g (ของกากมันสำปะหลังแห้ง) แต่อย่างไรก็ตาม ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของซักซิเนต (final concentrations) และค่าผลผลิตได้ (production yield) จากสภาวะการผลิตที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 (ความเข้มข้นของซักซิเนตคือ 52.00±0.20 g/L และค่าผลผลิตได้คือ 76.19±0.08 g/100 g ของกากมันสำปะหลังแห้ง) นอกจากนี้ เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลงจาก 6.5 เป็น 6.0 ส่งผลให้ความเข้มข้นและค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าเท่ากับ 48.35±0.71 g/L และ 71.74±0.28 g/100 g (ของกากมันสำปะหลังแห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบให้อัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อจุลินทรีย์ลดลงอีกด้วย และนอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และ 7.0 (รูปที่ 3.4 และ ตารางที่ 3.5) Agarwal et al. (2006) ได้รายงานผลการผลิตซักซิเนตจากกากน้ำตาลอ้อย (sugarcane molasses) และน้ำหมักข้าวโพด (corn steep liquor) ด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ที่พึ่งคัดแยกได้ (isolated strain) ว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและผลิตซักซิเนตได้สูงสุดเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 และความสามารถในการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำกว่าหรือสูงกว่า 6.5 รวมถึง Li et al. (2013) ยังได้แสดงวิธีการผลิตซักซิเนตจากก้านต้นฝ้าย (cotton stalk) โดยใช้เชื้อ *A. succinogenes* 130Z ภายใต้กระบวนการหมักแบบ SSF ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 นอกจากนี้ Van der Werf et al. (1997) ได้แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่น้อยกว่า 7.0 มีผลกระทบต่อการจะเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *A. succinogenes* 130Z จากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า ในกระบวนการผลิตซักซิเนตโดยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF จำเป็นจะต้องมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าคงที่เท่ากับ 6.5 ซึ่งจะใช้สภาวะที่เหมาะสมนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไปด้วย



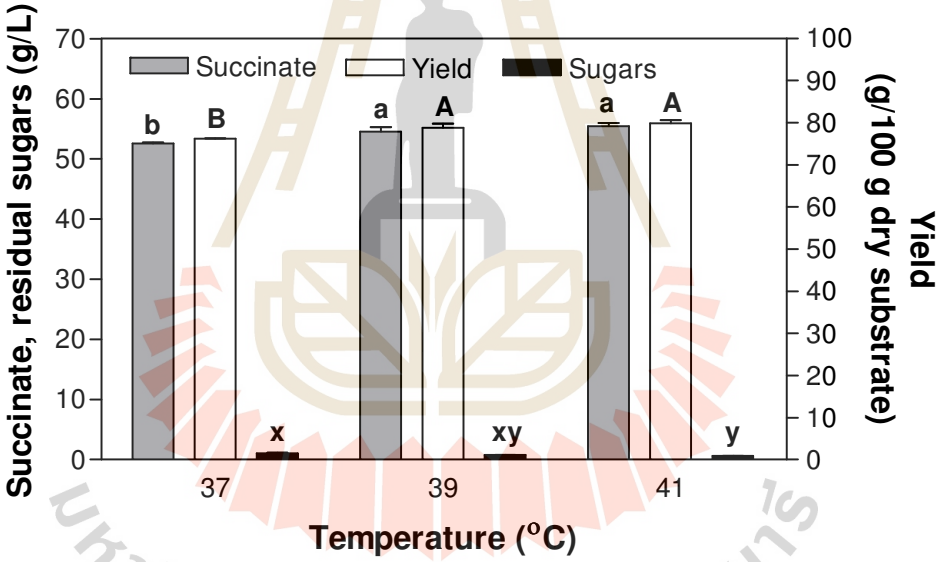
รูปที่ 3.4 ผลของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *E. coli* KJ122. ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็น 2% AMG and 3% (v/w, on dry matter) cellulase complex. กราฟแท่งที่มีตัวอักษร (a–c succinate, A–C yield, x–z residual sugars) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$).

ผลของอุณหภูมิ

เชื้อ *E. coli* KJ122 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลังคือประมาณ 50 องศาเซลเซียส (แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์) ดังนั้น การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดทั้งสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในช่วง 37 ถึง 41 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก รูปที่ 3.5 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF พบว่า ที่อุณหภูมิในการหมักเท่ากับ 41 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตซักซิเนตได้ค่าความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 55.42±0.53 g/L และมีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 79.86±0.77 g/100 g (ของกากมันสำปะหลังแห้ง) แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองดังกล่าวนี้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลการทดลองที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลผลิตได้เท่ากับ 54.54±0.69 g/L และ 78.77±1.02 g/100 g (ของกากมันสำปะหลังแห้ง) ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลผลิตได้มีค่าลดลงเล็กน้อย (52.54±0.16 g/L และ 76.19±0.08 g/100 g ของกากมันสำปะหลังแห้ง) (ตารางที่ 3.5) จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่า การเพิ่มอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF อาจทำให้เกิดการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ให้สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้มากขึ้น เป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการผลิตซักซิเนตได้มากขึ้น นอกจากนี้ Zheng et al. (2010) ยังได้รายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการผลิตซักซิเนตโดยเชื้อ *A. succinogenes* ขึ้นจาก 38 เป็น 42 องศาเซลเซียส ในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในน้ำหมักหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักมีความเข้มข้นสูงขึ้น จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่

เหมาะสมที่สุดในการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF อยู่ในช่วง 39 ถึง 41 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาในส่วนของอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (enzymatic activity) จากการศึกษาของ Agarwal et al (2006) พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตช่วง 37 ถึง 39 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การผลิตซักซิเนตเกิดขึ้นได้สูงสุด แต่เมื่อใช้อุณหภูมิในการผลิตต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส กลับส่งผลให้การผลิตซักซิเนตได้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการทดลองดังกล่าวนี้ให้ผลตรงข้ามกับการทดลองของ Zheng et al. (2010) ที่รายงานว่าทั้งค่าความเข้มข้นและค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตที่ผลิตจากเชื้อ *A. succinogenes* CGMCC1593 มีค่าลดลงอย่างมากเมื่อช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 37 เป็น 42 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Zhu et al. (2012) ยังแสดงให้เห็นว่า ไม่ว่าจะทำการเพิ่มหรือลดอุณหภูมิในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในช่วง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ต่างก็มีผลทำให้เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารชีวเคมีด้วยเชื้อจุลินทรีย์และจลนพลศาสตร์ทางการหมัก (fermentation kinetic) จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF

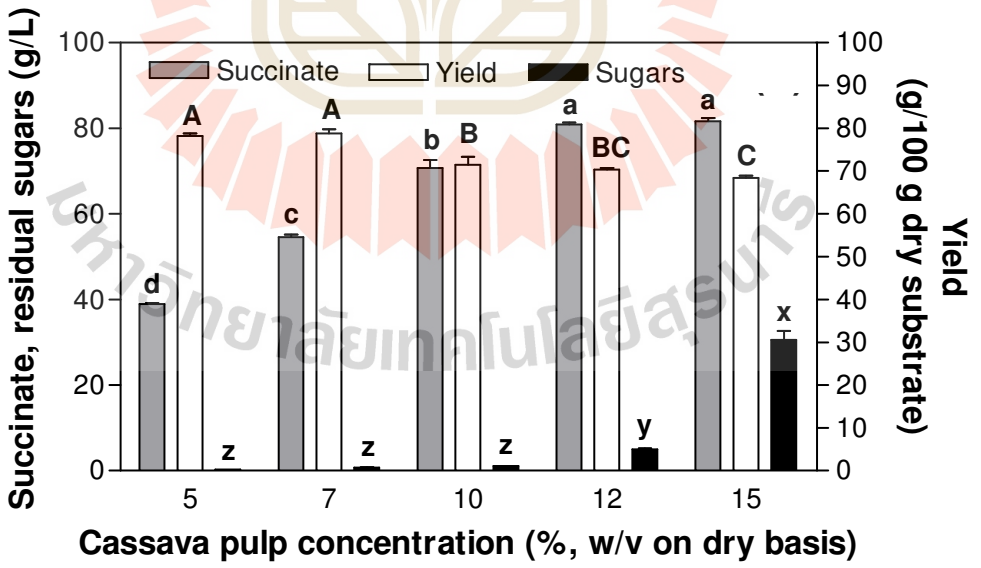


รูปที่ 3.5 ผลของอุณหภูมิในการหมักที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *E. coli* KJ122. ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็น 2% AMG and 3% (v/w, on dry matter) cellulase complex. กราฟแท่งที่มีตัวอักษร (a–c succinate, A–C yield, x–z residual sugars) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$).

ผลของความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า ควรจะต้องมีการศึกษาหาความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่นำไปใช้ในการผลิตสารชีวเคมีชนิดต่างๆ จากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตลง (Zhu et al., 2012) ความท้าทายของการใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงๆ ในการผลิต คือทำให้เกิดการต้านทานต่อความร้อนและการถ่ายเทมวลสารในระหว่างกระบวนการผลิตขึ้น ซึ่งเป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลของเอนไซม์ลดลง ดังนั้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหา

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากมันสำปะหลังที่จะนำมาใช้ในการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังขึ้นจาก 5 เป็น 15% (w/v) ส่งผลให้การผลิตซักซิเนตมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 15% (w/v) ทำให้สามารถผลิตซักซิเนตได้สูงสุดถึง 81.66±0.78 g/L (ค่าผลผลิตได้เท่ากับ 68.5±0.53 g/100 g ของกากมันสำปะหลังแห้ง) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 5% (w/v) ถึง 2.5 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม ค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้จากการใช้กากมันสำปะหลังที่ 12% (w/v) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 80.86±0.49 g/L (ค่าผลผลิตได้เท่ากับ 70.34±0.37 g/100 g ของกากมันสำปะหลังแห้ง) (รูปที่ 3.6 และ ตารางที่ 3.5) นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังขึ้นมากกว่า 15% (w/v) จะทำให้เกิดปัญหาในการกวนผสมขึ้นระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการถ่ายเทความร้อนและการถ่ายมวลสารลดลง เนื่องจากว่ามีปริมาณของแข็งมากเกินไป จึงทำให้การผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu et al. (2012) ที่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังขึ้นมากกว่า 16% (w/v) ส่งผลให้การผลิตและประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลด้วยกระบวนหมักด้วยวิธี SSF แบบกะ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกเหนือจากนี้ ยังพบว่าการใช้กากมันสำปะหลังแห้งที่ความเข้มข้น 15% (w/v) มีปริมาณน้ำตาลหลงเหลือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ระดับความเข้มข้น 30.54±1.46 g/L เมื่อเทียบกับกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 12% (w/v) มีปริมาณน้ำตาลหลงเหลืออยู่เพียง 5.04±0.09 g/L เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณน้ำตาลที่หลงเหลืออยู่หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักนี้ อาจจะไปรบกวนและก่อให้เกิดความยุ่งยากซับซ้อนในระหว่างกระบวนการทำบริสุทธิ์และการแยกซักซิเนตขึ้น และอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์ (purification) ลดลงได้



รูปที่ 3.6 ผลของความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 อุณหภูมิในการหมักที่ 39 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *E. coli* KJ122. ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็น 2% AMG and 3% (v/w, on dry matter) cellulase complex. กราฟแท่งที่มีตัวอักษร (a–c succinate, A–C yield, x–z residual sugars) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$).

ตารางที่ 3.5 แสดงค่าต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลัง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF แบบกะ จากเชื้อ *E. coli* KJ122

Parameters	Residual sugars (g/L)	Succinate (g/L)	Acetate (g/L)	Yield (g/100 g dry pulp)
pH				
6.0	2.60±0.72^{a}	48.35±0.71^{b}	5.95±0.20^{d}	71.74±0.28^{b}
6.5	1.03±0.15^{b}	52.54±0.16^{a}	7.16±0.44^{c}	76.19±0.08^{a}
7.0	0.70±0.06^{b}	52.00±0.20^{a}	7.11±0.14^{c}	75.04±0.04^{a}
Temperature (°C)				
37	1.03±0.15^{a}	52.54±0.16^{b}	7.16±0.44^{c}	76.19±0.08^{b}
39	0.72±0.03^{ab}	54.54±0.69^{a}	7.22±0.06^{c}	78.77±1.02^{a}
41	0.60±0.01^{b}	55.42±0.53^{a}	7.32±0.10^{c}	79.86±0.77^{a}
Cassava concentration (%, w/w on dry basis)				
5	0.27±0.01^{c}	38.91±0.24^{d}	4.11±0.07^{e}	78.26±0.49^{a}
7	0.72±0.03^{c}	54.54±0.69^{c}	7.22±0.06^{c}	78.77±1.02^{a}
10	1.05±0.01^{c}	70.72±1.86^{b}	11.37±0.18^{b}	71.47±1.89^{b}
12	5.04±0.09^{b}	80.86±0.49^{a}	13.36±0.10^{a}	70.34±0.37^{bc}
15	30.54±1.46^{a}	81.66±0.78^{a}	13.61±0.06^{a}	68.36±0.53^{c}

An enzyme loading was 2% AMG and 3% (v/w, on dry matter) cellulase complex.

All data represent the averages of at least two fermentations with standard deviations.

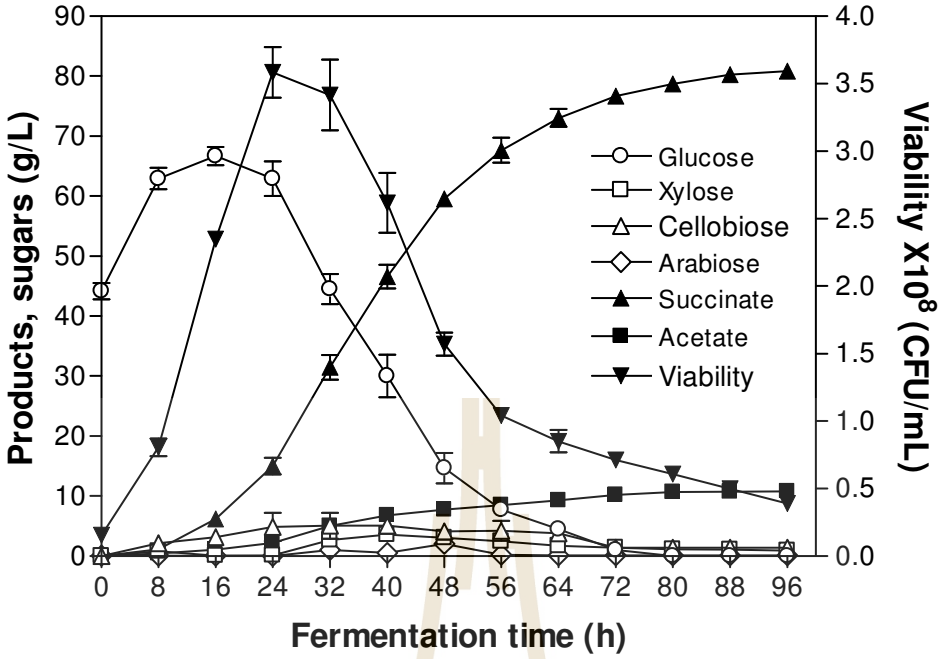
$^{(a-e)}$ The values with different symbols in the same row are significantly different ($p<0.05$).

การผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

รูปที่ 3.7 แสดงระยะเวลาในการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 12% (w/v) โดยเชื้อ *E. coli* KJ122 พบว่ากากมันสำปะหลังถูกย่อยทันทีหลังจากที่เติมเอนไซม์ลงไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งทำให้น้ำตาลที่สามารถใช้ในการหมักได้ (fermentable sugar) ถูกปลดปล่อยออกมาหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะมีปริมาณสูงสุดเมื่อระยะเวลาในการหมักที่ 16 ชั่วโมง ก่อนที่จะมีปริมาณลดลงและหลังจากนั้นจึงถูกใช้ไปอย่างสมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์เมื่อระยะเวลาในการมักผ่านไป 72 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญเติบโตในชั่วโมงที่ 8 และมีการเจริญเติบโตสูงสุดด้วยการเพิ่มจำนวนแบบชี้กำลัง (exponential growth) ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 3.58±0.32x10^{9} CFU/mL และเมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้นลงสามารถผลิตซักซิเนตที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 80.86±0.49 g/L มีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 70.34±0.37 g/100 g ของกากมันสำปะหลังแห้ง พร้อมทั้งค่าอัตราผลผลิตที่ 0.84±0.01 g/L/h ทำให้ค่าอัตราผลผลิตจำเพาะจากการผลิตซักซิเนตมีค่าเท่ากับ 272 mg/g CDW/h มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ได้รับการตีพิมพ์เกี่ยวกับการผลิตซักซิเนตจจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ด้วยเชื้อ *A. succinogenes* โดยใช้กระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ ได้แก่ Zheng et al.

(2010) ที่แสดงให้เห็นผลการผลิตซักซิเนตจากซังข้าวโพด (corn stover) โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF ว่าซักซิเนตที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 47.4 g/L มีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 72 g/100g (ซังข้าวโพด) และมีค่าอัตราผลผลิตเท่ากับ 0.98 g/L/h นอกจากนี้ Leng et al. (2012) ได้รายงานการผลิตซักซิเนตจากของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมผลิตขนมปัง (waste bread) ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 47.4 g/L และมีค่าผลผลิตได้เพียง 55 g/100 g (น้ำตาล) รวมถึง Chen et al. (2011) ยังได้แสดงให้เห็นถึงการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF จากการใช้กากเรพซีด (rapeseed meal) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยซักซิเนตที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 15.5 g/L และมีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 12.4 g/100 g (กากเรพซีด) (ตารางที่ 3.2) จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 12% (w/v) มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตซักซิเนตสามารถดำเนินงานไปได้โดยง่าย

เป็นที่น่าสนใจว่าทั้งน้ำตาลไซโลส (xylose) และน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) ต่างก็ถูกเชื้อจุลินทรีย์นำไปใช้อย่างรวดเร็ว (co-metabolized) พร้อมๆ กับน้ำตาลกลูโคส โดยน้ำตาลอะราบิโนสจะถูกใช้ไปอย่างสมบูรณ์หลังจากการหมักผ่านไป 56 ชั่วโมง ส่วนน้ำตาลไซโลสจะถูกใช้ไปเกือบหมดในระหว่าง 56 ชั่วโมงแรกของการหมักที่มีน้ำตาลกลูโคสอยู่ แต่หลังจากผ่านไป 64 ชั่วโมง ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากกากมันสำปะหลังจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นถึง 7 g/L และหลังจากนั้นจะเชื้อจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลไซโลสอย่างช้าๆ และความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อจุลินทรีย์จะลดลงขึ้นเมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดแล้ว ซึ่งสามารถอธิบายจากหลักความจริงที่ว่า กลไกการยับยั้งการใช้น้ำตาลตัวอื่นๆ ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *E. coli* KJ122 ถูกกดไว้ (de-repression a catabolic repression) เนื่องจากระบบการนำเข้าน้ำตาลกลูโคสโดยธรรมชาติ (native glucose PTS system) ของเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานได้ตามปรกติ (inactivation) ส่งผลให้ปลดปล่อย cAMP-CRP complex ออกมาจำนวนมาก (Zhang et al., 2009) นอกจากนี้การนำเข้าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* ด้วยระบบ xylose-ABC transporter ยังต้องใช้พลังงานในรูป ATP อีกด้วย Jiang et al. (2014) รายงานไว้ว่า การผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสนั้น ได้พลังงาน ATP สะสมเพียง 1.67 mol ต่อน้ำตาลไซโลส 1 mol ในขณะที่การนำเข้าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* ที่ผลิตซักซิเนตได้นั้น ต้องการพลังงานถึง 2.67 ATP ฉะนั้นเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นจะต้องสร้างพลังงาน ATP ให้มากพอสำหรับการสันดาปน้ำตาลไซโลส ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 อาจจะใช้ ATP ที่ถูกสร้างจากการสันดาปของน้ำตาลกลูโคสเพื่อการใช้น้ำตาลไซโลสให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถ้าไม่มีน้ำตาลกลูโคส ปริมาณของ ATP ไม่เพียงพอ เป็นผลให้อัตราการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ เชื้อ *E. coli* KJ122 ช้าลงด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการใช้น้ำตาลเซลโลไบโอสก็ลดลงด้วยเมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปหมดแล้ว เนื่องจากกลไกความลึกลับ(cryptic) ซับซ้อนของกลุ่มยีน β-glucoside metabolic operon ซึ่งปรากฏการณนี้เหมือนกับกับที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักแบบ SHF ที่กล่าวไปแล้วก่อนหน้านี้ (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.7 ระยะเวลาในการผลิตซักซิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบ SSF แบบกะ ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยใช้กากมัน 12% (w/w) ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็น 2% AMG and 3% (v/w, on dry matter) cellulase complex. ที่ pH คงที่ 6.5 และอุณหภูมิ 39°C

การผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการผลิตแบบการ SSF แบบกึ่งกะ (fed-batch simultaneous sacharification and fermentation; fed-batch SSF) ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

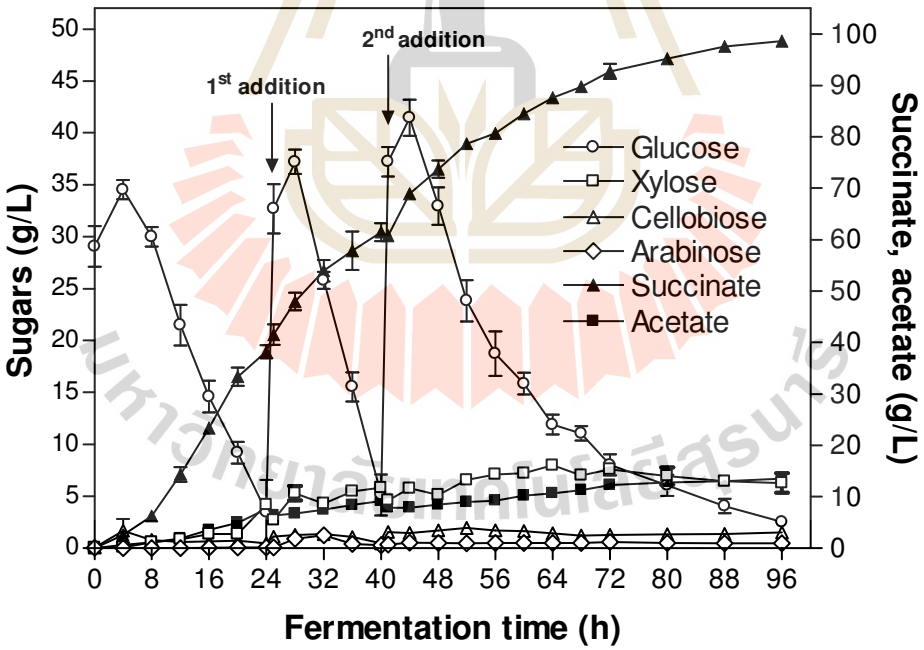
โดยทั่วไปแล้วการดำเนินงานด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF จะใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงในการผลิต เพื่อลดปริมาณการใช้พลังงานและการใช้น้ำในระหว่างกระบวนการทำงานทั้งหมดลง ซึ่งจะสามารถทำให้ลดต้นทุนในการผลิตได้ (Sassner et al., 2006) อย่างไรก็ตาม การดำเนินงานภายใต้กระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ จะเป็นไปได้ยากขึ้น เมื่อมีการใช้สารตั้งต้นในปริมาณมาก เนื่องจากจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มีความหนืดสูงขึ้น ซึ่งการนำกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ มาใช้ในการผลิต จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะช่วยจัดการปัญหาในกรณีที่มีการใช้สารตั้งต้นในปริมาณสูงได้ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้กระบวนการหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะในการทดลองเพื่อผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร จากผลการทดลองดังรูปที่ 3.8 แสดงให้เห็นว่า หลังจากที่มีการเติมกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 5% (w/v) ในชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 40 ของกระบวนการหมัก ทำให้ซักซิเนตที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 98.63± 0.12 g/L มีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 71.64±0.97 g/ 100 g (ของกากมันสำปะหลังแห้ง) และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 1.03±0.01 g/L/h และพบว่าการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ สามารถทำให้อัตราการผลิตและค่าผลผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มขึ้นเท่ากับ 21.98 และ 22.62% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ แต่อย่างไรก็ตามค่าผลผลิตได้ทั้งจากการผลิตแบบกะและแบบกึ่งกะมีค่าเทียบเท่ากัน เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Chen et al. (2011) ที่พิสูจน์ให้เห็นว่าการผลิตซักซิเนตจากกากเรพซีด

(rapeseed meal) โดยใช้เชื้อ *A. succinogenes* ในกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ สามารถเพิ่มความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้จาก 15.5 g/L เป็น 23.4 g/L และเพิ่มค่าอัตราการผลิตขึ้นจาก 0.22 เป็น 0.33 g/l/h โดยเหตุผลสำหรับกรณีนี้อาจจะเกิดจากความจริงที่ว่ากระบวนการหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ สามารถลดความเข้มข้นเริ่มต้นของกากมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อลงและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลสารและการถ่ายเทความร้อน ซึ่งส่งผลให้ปฏิกิริยาในการย่อยและกระบวนการหมักเกิดได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

เมื่อไม่นานมานี้ Chen et al. (2014) ได้แสดงให้เห็นว่า สามารถผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* NZN111 ที่มีความเข้มข้นและค่าผลผลิตได้ที่สูงมาก โดยความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 105.13 g/L มีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 78 g/ 100 g แป้งมันสำปะหลัง และค่าอัตราการผลิตโดยรวมเท่ากับ 1.38 g/L/h อย่างไรก็ตาม Chen et al. (2014) ได้ผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักแบบสองขั้นตอน (two-stage fermentation) คือเริ่มด้วยการเลี้ยงเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในปริมาณสูง (high-cell-density) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) จากนั้นจึงเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) เพื่อให้เชื้อผลิตซักซิเนต และใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งถึงแม้ว่าจะสามารถผลิตซักซิเนตให้มีความเข้มข้นสูงถึง 127 g/L ก็ตาม แต่ค่าผลผลิตได้กลับมีค่าต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเพียง 71 g ซักซิเนต/ 100 g แป้งมันสำปะหลัง เนื่องจากใช้เชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากในการผลิตและยังใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสูงอีกด้วย นอกจากนี้ Chen et al. (2014) ยังได้กล่าวอ้างว่าอัตราผลผลิตจำเพาะของซักซิเนตที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 338 mg/g CDW/h อีกด้วย ในทางตรงกันข้ามกับ Chen et al. (2014) รวมถึงงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์อื่นๆ สภาวะในการผลิตซักซิเนตในการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างออกไป โดยจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) เป็นส่วนประกอบมากกว่าการใช้อาหารที่มีความซับซ้อน (complex media) ไม่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการหมัก และใช้กระบวนการหมักแบบกะอย่างง่ายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นพร้อมกันในขั้นตอนเดียว ซึ่งการผลิตซักซิเนตเกิดขึ้นขั้นตอนเดียวในการศึกษานี้นั้น ซักซิเนตจะถูกผลิตได้จากการใช้ความเข้มข้นสูงสุดของเชื้อที่ต่ำกว่า (maximum cell dry weight; CDW) 2.52 g/L และไม่มีการเสริมด้วยแหล่งอาหารอื่นๆ นอกเหนือจากกากมันสำปะหลังในขณะที่เชื้อมีการเจริญ ซึ่งเป็นผลให้เชื้อ *E. coli* KJ122 มีอัตราการผลิตซักซิเนตจำเพาะ (specific succinate productivity) เท่ากับ 409 mg/g CDW/h ในระหว่างการหมักแบบกึ่งกะด้วยกากมันสำปะหลัง ทั้งนี้ค่าอัตราการผลิตซักซิเนตจำเพาะในการศึกษานี้สูงกว่าที่รายงานในการศึกษาของ Chen et al. 2014 ฉะนั้นสภาวะการหมักในการศึกษานี้จึงมุ่งหมายเพื่อลดต้นทุนในการผลิตซักซิเนตลง เนื่องจากกระบวนการผลิตซักซิเนตและการเจริญของเชื้อนั้นใช้แหล่งวัตถุดิบและอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการทำบริสุทธิ์และกระบวนการกำจัดของเสียที่จะเกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตในทางอ้อมด้วย

ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลผลิตได้ในการผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการศึกษาของ Chen et al. (2014) จะมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังในการผลิตซักซิเนต เนื่องจากความจริงที่ว่า การทำงานของเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมากกว่า ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สามารถใช้ในการหมักได้มากกว่า โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส ที่ช่วยทำให้การผลิตซักซิเนตเกิดได้สูงขึ้น ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ใช้กากมันสำปะหลังที่มีเส้นใย (crude fiber)เป็นส่วนประกอบถึง 14.08±0.03% ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) (ตารางที่ 3.2) ทั้งนี้เส้นใยของเซลลูโลสเหล่านั้นจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยแป้งที่อยู่ในกากมันได้

ยากขึ้นจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ลดลง (Martinez et al., 2007) รวมถึงในขณะการย่อยและการหมักนั้น ได้ปลดปล่อยน้ำตาลเซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยในมันสำปะหลัง ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วเชื้อ *E. coli* KJ122 จะมีศักยภาพในการใช้น้ำตาลชนิดนี้ได้น้อยกว่ากลูโคสอีกด้วย อย่างไรก็ตาม เป็นที่รู้กันดีว่ากากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรและมีราคาขายอยู่ที่ประมาณกิโลกรัมละ 0.016 ดอลลาร์เท่านั้น ซึ่งเป็นราคาที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับราคาของมันเส้น (cassava root) และแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) รวมทั้งยังถูกจำกัดการใช้เป็นเพียงแค่เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ราคาถูกๆ เท่านั้น (Sriroth et al., 2000; Virunanona et al., 2013) ราคาของเอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ (cellulose complex) และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (AMG) ตกอยู่ที่กิโลกรัมละ 16.17 และ 7.57 ดอลลาร์ ตามลำดับ โดยจะมีราคาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับผู้ผลิต อีกทั้งต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 มีค่าประมาณลิตรละ 0.43 ดอลลาร์ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าต้นทุนที่ใช้ในการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังจะมีราคาประมาณกิโลกรัมละ 5.53 ถึง 6.44 ดอลลาร์ ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่าการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการทางปิโตรเคมี (petro-chemically) ที่มีต้นทุนในการผลิตประมาณ 5.9 ถึง 8.8 ดอลลาร์ ต่อกิโลกรัม (Zeikus et al., 1999) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตซักซิเนต จะช่วยทำให้กากมันสำปะหลังที่ราคาตกต่ำ มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเปลี่ยนเศษวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรให้กลายเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าสูงขึ้นอีกด้วย



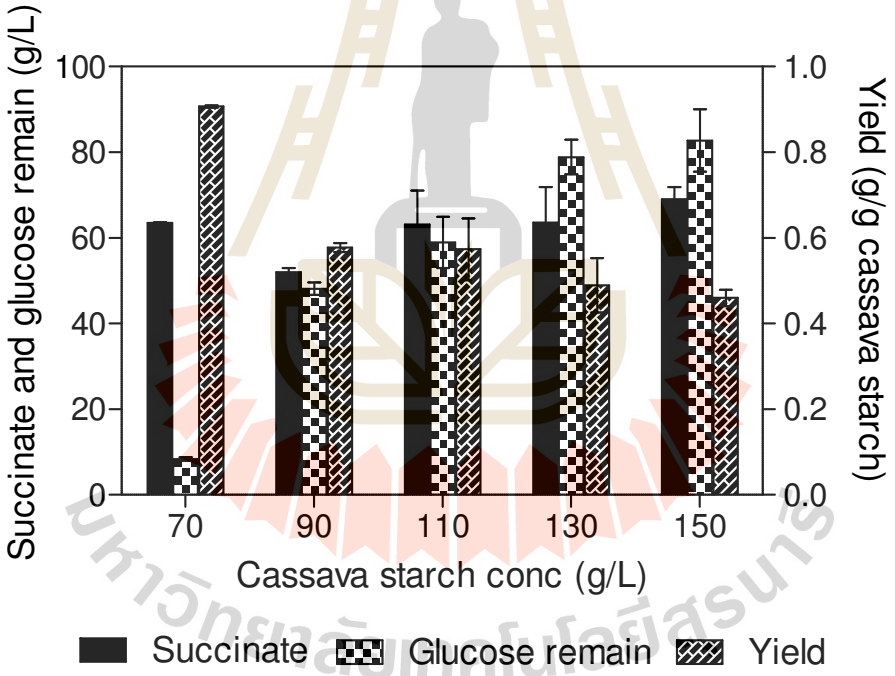
รูปที่ 3.8 แสดงระยะเวลาในการผลิตซักซิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบ SSF แบบกึ่งกะ ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยใช้กากมันเริ่มต้น 5% (w/w) ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็น 2% AMG and 3% (v/w, on dry matter) cellulase complex หลังจาก 24 ชั่วโมงจะมีการเติมกากมันพร้อมกับเอนไซม์เพื่อให้มีกากมันความเข้มข้น 15% (w/w) ที่ pH คงที่ 6.5 และอุณหภูมิ 39°C

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตซักซิเนตในระหว่างกระบวนการผลิตแบบการย่อยและการหมักในขั้นตอนเดียว (SSF) จากแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122

ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

ในการใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นแบบไม่แข่งขันขึ้น (uncompetitive-substrate inhibition) ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงและทำให้เกิดยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตแบบการย่อยและการหมักในขั้นตอนเดียว (SSF) (Tango and Ghaly, 1999) เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ที่ใช้ในระหว่างกระบวนการ SSF จึงได้มีการศึกษาผลความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจากช่วง 70 ถึง 150 g/L ในการผลิตซักซิเนต (succinate) จากเชื้อ *E. coli* KJ122 ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 150 g/L ส่งผลให้ซักซิเนตที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 66.0±2.8 g/L และค่าผลได้ (yield) เท่ากับ 0.46±0.02 g/g ของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไป (รูปที่ 3.8) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการผลิตซักซิเนตทั้งที่ระดับ 70, 110, หรือ 130 g/L พบว่าไม่มีผลทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 70 g/L ทำให้ค่าผลได้ของซักซิเนตมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.91±0.03 g/g ของแป้งมันสำปะหลัง และดูเหมือนว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในน้ำหมักให้สูงขึ้นจะมีผลทำให้ค่าผลได้ของซักซิเนตมีค่าลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ในการหมักทุกสภาวะยังมีน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยได้จากแป้งมันสำปะหลังเหลืออยู่ในน้ำหมักถึงแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาในการหมักเป็น 72 ชั่วโมง แล้วก็ตาม กลูโคสที่เหลืออยู่นี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในน้ำหมักมากขึ้น (รูปที่ 3.8) จากผลการทดลองนี้สะท้อนให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังขึ้นนั้น ส่งผลทำให้ค่าผลได้ของซักซิเนตมีค่าลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นเชื้อที่ใช้ (biomass) มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตที่ 70 g/L และจะมีค่าลดลงอย่างมากเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมากกว่า 90 g/L ทั้งนี้ในกระบวนการทางชีวภาพ ต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกหนึ่งปัจจัยหลักที่นำมาพิจารณาศักยภาพของกระบวนการผลิตสารชีวเคมีต่างๆ รวมทั้งกรดซักซินิกด้วย ดั้งนั้นในการศึกษานี้ จะใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีราคาถูกในการผลิตซักซินิกด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีการสร้างและการสลาย นอกจากนี้ยังศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ KJ122 ด้วยกระบวนการ SSF อีกด้วย การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของแป้งมันสำปะหลังสามารถหาได้จากการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของซักซิเนต, กลูโคสที่หลงเหลือและค่าผลได้ ซึ่งสังเกตได้ว่าความเข้มข้นของซักซิเนตที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังขึ้น แต่ค่าผลผลิตได้ (production yield) กลับมีค่าลดลงอย่างมากเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นจาก 70 เป็น 150 g/L อย่างไรก็ตาม ซักซิเนตที่ผลิตได้จากแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 110 ถึง 150 g/L มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 70 g/L ยิ่งไปกว่านั้น กลูโคสที่หลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังขึ้น ทั้งนี้การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 g/L ในการผลิตซักซิเนตทำให้ค่าผลผลิตได้มีค่าสูงสุด 0.91 g/g และมีกลูโคสหลงเหลือในปริมาณต่ำเพียง 8.40±0.43 g/L เมื่อเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 90 ถึง 150 g/L ซึ่งมีปริมาณกลูโคสหลงเหลือสูงถึง 32 ถึง 83 g/L อาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณกลูโคสหลงเหลือที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่แป้งมันสำปะหลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ อาจไปยับยั้งการใช้น้ำตาลและการผลิตซักซิเนตของ

เชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chan et al. (2012) และ Agarwal et al. (2006) ที่ได้ศึกษาการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* โดยการใช้น้ำตาลซูโคส (sucrose) และกากน้ำตาลอ้อย (sugarcane molasses) ที่ระดับความเข้มข้นสูง เช่นเดียวกับ Wang et al. (2010) ได้รายงานว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากทำให้ปริมาณน้ำอิสระในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ซึ่งส่งผลกระทบต่ออัตราการสันดาปอาหารภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้ Zhue et al. (2012) ชี้ให้เห็นอีกด้วยว่า ความเข้มข้นของเอทานอล และค่าผลได้ ที่ได้จากการผลิตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF นั้น มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อลดความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง (cassava pulp) ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อลง นอกเหนือจากนี้ Wang et al. (2010) ได้ศึกษาการผลิตสารกรดแลคติกชนิดแอล (L-lactic acid) จากเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ (crude cassava powder) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้กระบวนการ SSF พวกเขาพบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณมากๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์บางส่วนถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและส่งผลทำให้การผลิต L-lactic acid ลดลง พวกเขายังได้รายงานไว้อีกว่า ไซยาไนด์ (cyanides) เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในมันสำปะหลังซึ่งเป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารชีวเคมีภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์



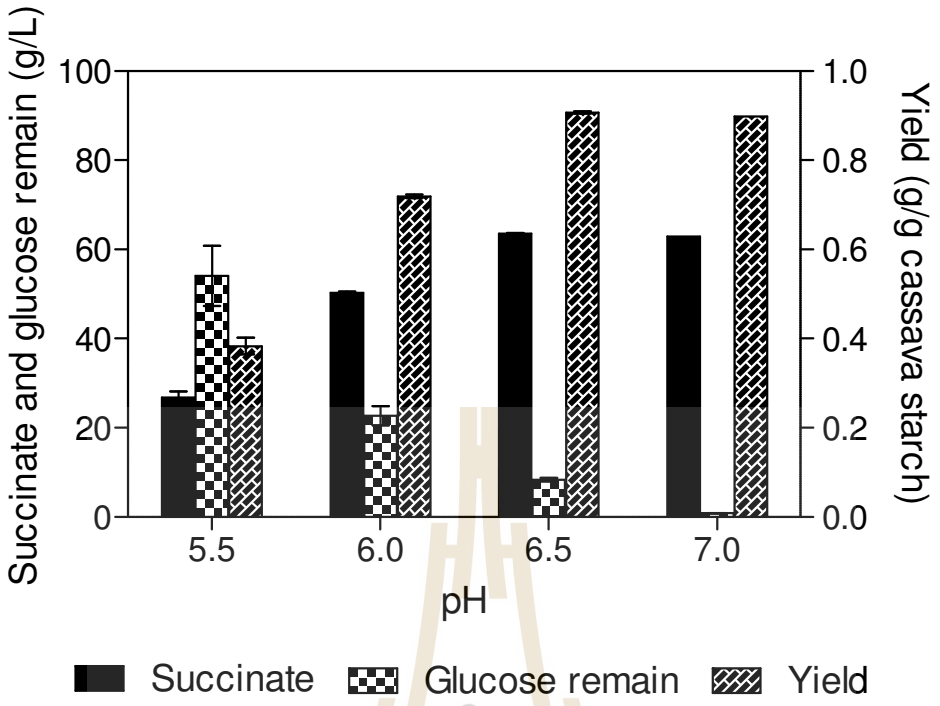
รูปที่ 3.9 แสดงการผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ ภายใต้สภาวะการผลิต: ปริมาณเอนไซม์ 500 U AMG/g (แป้งมันสำปะหลัง), ความเร็วในการกวน 200 rpm, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 0.1 OD_{550}

ผลของความเป็นกรด-ด่าง

สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (AMG) ในการย่อยวัตถุดิบจำพวกแป้ง (starchy materials) อยู่ในช่วง 3.5 ถึง 5.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับข้อกำหนดเฉพาะของผู้ผลิต (manufacturer's specification) อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถทำการ

หมักเชื้อ *E. coli* KJ122 ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 5.5 ในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ได้ ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงต้องพิจารณาผลของความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซักซินิก (succinic acid) ของเชื้อ *E. coli* KJ122 ด้วย จากการทดลองพบว่าการเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 5.5 ถึง 7.0 ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณชีวมวล (Biomass) เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.9) ดังที่คาดการณ์ไว้ การผลิตซักซิเนตมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 5.5 เป็น 6.5 โดยความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 63.5±0.2 g/L ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 (62.8±2.3 g/L) นอกจากนี้ ค่าผลได้ของซักซิเนตที่ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และ 7.0 มีค่าเท่ากับ 0.91 g/g ของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5 และ 6.0 มีค่าผลได้ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 0.37±0.02 และ 0.72±0.01 g/g ของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ ตามลำดับ และยังพบว่าในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ KJ122 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ยังคงมีกลูโคสหลงเหลืออยู่ในระดับความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 0.85±0.03 g/L เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า (รูปที่2.2) จากการทดลอง อาจชี้ให้เห็นว่า การที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 มีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ลดการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลลง เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดมากเกินไป จะส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลายจนสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ไป

ในการรักษาสมดุลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูง สามารถทำได้ด้วยการเติมสารละลายด่างจำนวนมากลงไป แต่อย่างไรก็ตาม การเติมสารละลายด่างนี้ทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิตขึ้น ในการทดลองนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้นจาก 6.5 เป็น 7.0 ไม่มีผลทำให้ค่าผลได้และค่าความเข้มข้นของซักซิเนตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น การผลิตซักซิเนตในครั้งนี้จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6.5 และจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไปอีกด้วย ปรากฏการณ์นี้ยังถูกพบในระหว่างการผลิตซักซิเนต และการผลิตสารชีวเคมีชนิดอื่นภายใต้กระบวนการหมักแบบ SSF อีกด้วย เมื่อไม่นานมานี้ Sawisit et al. (2015) ได้ผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ในการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้ได้น้ำตาลที่สามารถใช้ในกระบวนการหมักได้ (fermentable sugars) ภายใต้กระบวนการหมักแบบ SSF พวกเขาพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.5 มีความเข้มข้นของน้ำตาลหลงเหลืออยู่ในปริมาณที่สูง อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าระหว่าง 6.5 และ 7.0ไม่ทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Wang et al. (2010) ได้ทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นเพื่อใช้ในการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล (2,3 butanediol) ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF จากเชื้อ *Enterobactor cloacea* subsp. ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร พบว่าเชื้อแบคทีเรียเริ่มใช้แป้งมันสำปะหลังดิบและผลิต 2,3 บิวเทนไดออล ได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงสุดประมาณ 6.0 ถึง 6.5 ทั้งนี้ Agarwal et al. (2006) ยังได้ศึกษาต้นทุนและประสิทธิผลของกระบวนการหมักในการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้กากน้ำตาลอ้อยและน้ำหมักข้าวโพด (corn steep liquor) จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ธรรมชาติ (wild type) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบทั้งต่อการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตของเชื้อจุลินทรีย์ และยังรายงานอีกด้วยว่าสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซักซินิกมีค่าเท่ากับ 6.0



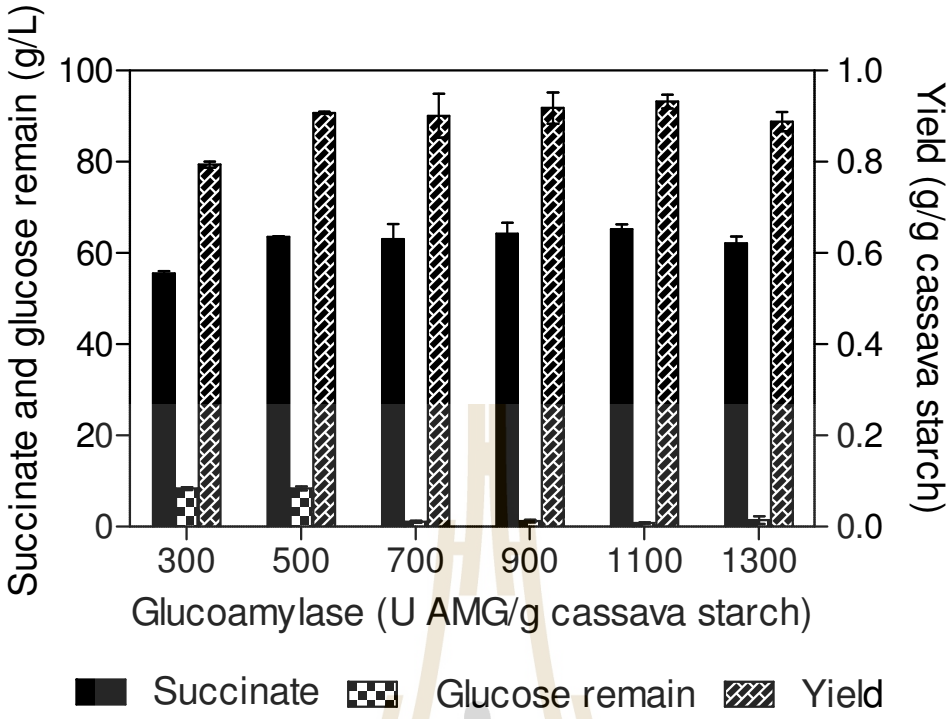
รูปที่ 3.10 แสดงระยะเวลาในการหมักแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 70 g/L ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในการผลิตซักซิเนตโดยใช้กระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่างๆ ภายใต้สภาวะการผลิต : ปริมาณเอนไซม์ 500 U AMG/g (แป้งมันสำปะหลัง), ความเร็วในการกวน 200 rpm, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 0.1 OD_{550}

ผลของปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ใช้

อีกปัญหาหนึ่งที่ยังคงเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกรดซักซินิกด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ในระดับการผลิตที่ใหญ่ขึ้น (ระดับอุตสาหกรรม) คือ ต้นทุนของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ใช้ ทั้งนี้เราสามารถลดต้นทุนของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถ้าหากว่าลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ลง โดยปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาจะอยู่ในช่วง 300 ถึง 1300 U/g ของแป้งมันสำปะหลัง เพื่อทำการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลัง (liquefied cassava starch) ที่มีความเข้มข้น 70 g/L ให้กลายเป็นน้ำตาลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 โดยซักซิเนตที่ผลิตได้จากการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ระดับ 300 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง มีความเข้มข้นเพียง 55.6±0.3 g/L และมีค่าผลได้เท่ากับ 0.79±0.001 g/g แป้งมันสำปะหลัง เท่านั้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นในช่วง 500 ถึง 1300 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง ส่งผลให้ทั้งปริมาณซักซิเนตและค่าผลได้มีค่าเพิ่มขึ้น โดยสามารถเพิ่มความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้เป็น 62 ถึง 64 g/L และเพิ่มค่าผลได้ขึ้น 0.89 ถึง 0.91 g/g แป้งมันสำปะหลัง ทั้งนี้พบว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ในช่วง 300 ถึง 500 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง มีผลกระทบในเชิงลบต่อปริมาณกลูโคสที่หลงเหลือมากกว่าการใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงกว่า 500 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง (รูปที่ 2.3) ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่น้อยเกินไปทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (saccharification) ได้น้อยลง ซึ่งอาจส่งผลให้ระดับการจัดเรียงตัว (degree of polymerized) ของ

กลูโคสในน้ำแป้งมันสำปะหลังเกิดขึ้นได้มากกว่าสภาวะที่มีการใช้เอนไซม์ที่มีปริมาณสูงกว่า 700 ถึง 1300U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง และอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* KJ122 สามารถใช้น้ำตาลที่มีระดับการจัดเรียงตัวที่สูงของสายโซ่กลูโคส (glucose chains) ได้ช้าลง ซึ่งเป็นเหตุให้มีปริมาณกลูโคสหลงเหลืออยู่ในน้ำหมักเป็นจำนวนมาก แต่เป็นที่น่าแปลกใจว่าปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในระดับต่างๆ ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* KJ122 เลย (รูปที่ 3.10)

การหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นต่อกระบวนการหมักแบบ SSF เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของซักซิเนต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตสูงสุด รวมทั้งเพื่อลดต้นทุนในการผลิตโดยการลดปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ให้ต่ำลงด้วย รูปที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ระหว่าง 500 และ 1300 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง ไม่มีผลต่อความเข้มข้นและค่าผลได้ของซักซิเนตที่ผลิตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 นอกจากนี้ การใช้เอนไซม์ในปริมาณต่ำที่ 300 U AMG/g แป้งมันสำปะหลังมีผลทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้ลดลง ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ 500 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง จึงเหมาะสมที่สุดต่อการนำไปใช้สำหรับการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ทั้งนี้ Chen et al. (2011) ได้ศึกษาปริมาณเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) ที่เหมาะสมที่สุด ในการย่อยกากเรพซีด (rapeseed meal) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด (acid-pretreated) เพื่อใช้ในการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF พบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์เพคติ- เนสขึ้นจาก 1% เป็น 3% (v/w) ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้ของซักซิเนตเลย นอกจากนี้ การศึกษาของ Wang et al. (2010) ยังแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ปริมาณ 400 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง สามารถย่อยแป้งและปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสออกมาได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง เป็นผลให้เชื้อ *Enterobacter cloacea subsp.* สามารถผลิต 2,3 บิวเทนไดออลได้สูงสุดในทำนองตรงกันข้าม เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์มากกว่าหรือน้อยกว่า 400 U AMG/g แป้งมันสำปะหลังดิบ กลับมีผลกระทบในเชิงลบต่อกระบวนการผลิต 2,3 บิวเทนไดออลจากเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ Sawisit et al. (2015) ยังพบด้วยว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ (cellulose complex) ที่ความเข้มข้น 3% (v/w ของกากมันแห้ง) ร่วมกับเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้น 2% (v/w ของกากมันแห้ง) ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยกากมันสำปะหลังเกิดขึ้นสูงสุดในระหว่างการกระบวนการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ขึ้น ไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยกากมันสำปะหลังและการผลิตซักซิเนตเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด นอกเหนือจากนี้ ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณเกินความต้องการต่อกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตสารชีวเคมีจากเชื้อจุลินทรีย์ให้ต่ำลงได้



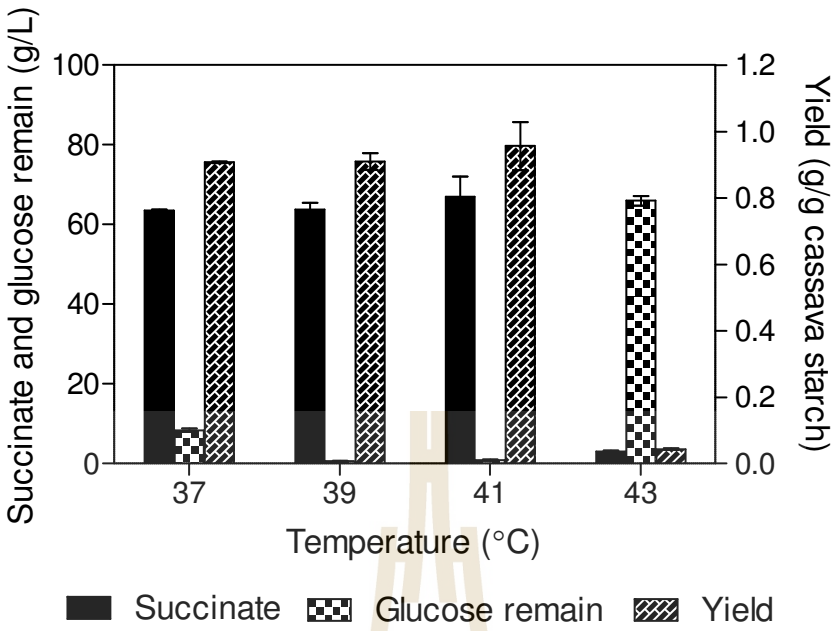
รูปที่ 3.11 แสดงผลของปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ ภายใต้สภาวะการผลิต : แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 g/L, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5, ความเร็วในการกวน 200 rpm, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 0.1 OD_{550}

ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพในกระบวนการหมักทางชีวภาพเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีผลต่อความสามารถในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ (enzymatic activity) และการรักษาสภาพการทำงานภายในเซลล์ (cellular maintenance) ของเชื้อจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์คือที่ 58 และ 60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคำแนะนำของผู้ผลิตเอนไซม์ด้วย อย่างไรก็ตาม เชื้อ *E. coli* KJ122 มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 37 ถึง 43 องศาเซลเซียส (Fotodar et al., 2005) และการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* KJ122 จะหยุดชะงักลงเมื่อมีอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (Jantama et al., 2008) ในการทดลองนี้ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาอุณหภูมิที่เหมาะสมทั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสในการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ที่มีช่วงอุณหภูมิจาก 37 ถึง 43 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตซักซิเนต การเจริญของจุลินทรีย์ และการใช้กลูโคสโดยเชื้อ *E. coli* KJ122 คือที่ 41 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตซักซิเนตที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ 66.9±5.1 g/L และมีค่าผลได้เท่ากับ 0.96±0.03 g/g แต่อย่างไรก็ตาม ดูเหมือนว่าอุณหภูมิในช่วง 37 ถึง 41 องศาเซลเซียส จะมีผลกระทบต่อความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้เล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ได้มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิทั้ง 39 และ 41 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของซักซิเนต และค่าผลได้มีค่าต่ำสุด คือ 0.27 g

CDW/L, 3.1±0.2 g/L, และ 0.04 g/g แป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ (รูปที่ 3.11) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิที่สูงกว่า 41 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ เนื่องจากทำให้เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการสันดาปอาหารได้น้อยลงและผลิตซักซิเนตได้ต่ำมาก

อีกหนึ่งปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักแบบ SSF เพื่อใช้ในการผลิตสารชีวเคมี จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้นคือ ความสมดุลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักและการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสารตั้งต้น (Zhu et al., 2012) ดังนั้น จึงต้องศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสารตั้งต้น ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 37 เป็น 41 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* KJ122 ในขณะที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส กลับมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อสายพันธุ์นี้ ทั้งนี้พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *E. coli* KJ122 มีอัตราในการใช้กลูโคสที่ช้ากว่าเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 39 และ 41 องศาเซลเซียส นอกเหนือจากนี้ การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* KJ122 ทั้งที่อุณหภูมิ 39 และ 41 องศาเซลเซียส ไม่มีผลทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากมุมมองทางด้านเศรษฐศาสตร์ จะเห็นว่าการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่ามีความเหมาะสมกับกระบวนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าการใช้อุณหภูมิที่สูง ซึ่งจะทำให้มีการใช้พลังงานจากกระแสไฟฟ้ามากขึ้น ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF โดยผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว เช่น Sawisit et al. (2015) ที่ได้ศึกษาวิธีการผลิตซักซิเนตด้วยกากมันสำปะหลังจากเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักจากช่วง 37 ถึง 41 องศาเซลเซียส ไม่มีผลทำให้ความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาของทั้ง Zhu et al. (2012) และ Ohgren et al. (2006) ยังแสดงให้เห็นด้วยว่าทั้งการเพิ่มและการลดอุณหภูมิจากช่วง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ต่างก็มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Zheng et al. (2010) ได้ทดสอบการผลิตซักซิเนตจากซังข้าวโพด (corn stover) ภายใต้กระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้เชื้อ *Actinobacillus succinogenes* ที่ช่วงอุณหภูมิ 38 ถึง 42 องศาเซลเซียส พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการผลิตขึ้นสูงกว่า 38 องซาเซลเซียส มีผลทำให้ทั้งความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าผลได้มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ Martinez et al. (2011) พบว่าอุณหภูมิในช่วง 37 ถึง 42 องศาเซลเซียส ไม่ได้ทำให้ค่าผลได้ ค่าอัตราการผลิต และความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตโดยเชื้อ *E. coli* SBS550MG แตกต่างกันมากนัก



รูปที่ 3.12 แสดงผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อ การผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ ภายใต้สภาวะการผลิต : แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 g/L, ปริมาณเอนไซม์ 500 U AMG/g (แป้งมันสำปะหลัง), ความเร็วในการกวน 200 rpm, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 0.1 OD_{550}

การผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะและแบบกึ่งกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

ในการศึกษากระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ (Batch SSF) จะทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ใช้ปริมาตรน้ำหมัก (working volume) ทั้งหมด 1.5 ลิตร โดยจะใช้สภาวะและปัจจัยที่เหมาะที่สุดต่อการผลิตซักซิเนตจากการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งมีสภาวะดังนี้ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 70 g/L ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คือ 500 U AMG/g แป้งมันสำปะหลัง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 และอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง รูปที่ 3.12 (a) แสดงการผลิตซักซิเนตโดยใช้น้ำแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้อากาศระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF แบบกะ โดยเชื้อ *E. coli* KJ122 ซึ่งแหล่งคาร์บอนหลักที่ได้หลังจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส คือ น้ำตาลกลูโคส โดยจะมีความเข้มข้นสูงสุดเมื่อระยะเวลาในการบ่มผ่านไป 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นความเข้มข้นจะลดลงและถูกใช้ไปอย่างสมบูรณ์ด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง กรดซักซินิคที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดถึง 70.1±0.1 g/L และมีค่าอัตราการผลิตโดยเฉลี่ย (average productivity) เท่ากับ 0.97±0.01 g/L/h ทั้งนี้ในการลดต้นทุนของกระบวนการผลิตด้วยวิธีการหมักแบบ SSF นั้นควรจะต้องทำการผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในระดับสูงเพื่อลดการใช้พลังงานและปริมาณน้ำที่ใช้ทั้งหมดในกระบวนการผลิตลง (Sassner et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารตั้งต้นที่สูงส่งผลทำให้การหมักด้วย SSF แบบกะเป็นไปได้ยากขึ้น เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความหนืดที่สูงขึ้น ดังนั้นกระบวนการผลิตแบบกึ่งกะจึงเป็นอีกกลยุทธ์หนึ่งที่นำมาใช้ทดแทนในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสูงซึ่งจะส่งผลกระทบต่อค่าอัตราการผลิตและค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เพื่อเป็น

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตซักซิเนตให้สูงขึ้น ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้กระบวนหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ (fed-batch SSF) โดยจะศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตซักซิเนตที่สภาวะเดียวกันกับกระบวนการ SSF แบบกะ (batch SSF) อาทิเช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และอุณหภูมิในการหมัก ซึ่งปริมาณของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสจะถูกเติมลงไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของน้ำแป้งมันสำปะหลัง (liquefied solution of cassava starch) โดยน้ำแป้งมันสำปะหลังจะเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น (initial concentration) 300 g/L จากนั้นนำไปเติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้ได้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 30 g/L รูปที่ 3.12 (b) แสดงการผลิตซักซิเนตหลังจากที่มีการเติมน้ำแป้งมันสำปะหลังลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำนวน 2 ครั้ง ที่ชั่วโมงที่ 20 และ 28 ของการหมัก พบว่าความเข้มข้นของซักซิเนตที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุด 82.5±0.7 g/L ที่ค่าผลได้เท่ากับ 1.03±0.01 g/g และอัตราการผลิต (productivity) อยู่ที่ 1.15±0.01 g/L/h รวมทั้งค่าอัตราการผลิตจำเพาะ (specific productivity) ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 456 mg/g CDW/h จากการศึกษานี้ ค่าผลได้ของซักซิเนตมีค่าเท่ากับ 1.66 mol/mol กลูโคสที่ถูกใช้ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการผลิตแบบกึ่งกะ สามารถเพิ่มความเข้มข้นของซักซิเนต ค่าผลได้ และค่าอัตราการผลิต ให้สูงขึ้นได้ เมื่อเทียบกับกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF แบบกะ

ในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนตได้เป็นที่น่าพอใจ ซักซิเนตที่ผลิตได้มีความเข้มข้นและค่าผลได้เท่ากับ 70.1±0.1 g/L และ 1.01±0.01 g/g กลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตรวม (overall productivity) เท่ากับ 0.97±0.01 g/L/h ทั้งนี้ค่าผลได้และอัตราการผลิตของซักซิเนตที่ได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Jantama et al. (2008) ที่ผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งให้ค่าผลได้ตามทฤษฎี(theoretical yield) ในการผลิตซักซิเนตจากกลูโคสนี้ มีค่าเท่ากับ 1.71 mol/mol กลูโคส 1.01±0.01 g/g (1.12 g/g กลูโคส) จะเห็นว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนตที่มีค่าผลได้อยู่ในช่วง 1.4-1.5 mol/mol กลูโคสที่ถูกใช้ ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถเพิ่มค่าผลได้ของซักซิเนตที่ผลิตจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *E. coli* KJ122 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.01±0.01 g/g แป้งมันที่ถูกใช้ ได้สำเร็จ และมีค่าเทียบเท่ากับ 1.39 mol/mol กลูโคสที่ถูกใช้ (แป้งมันสำปะหลัง 1 g มีค่าเท่ากับกลูโคส 1.1 g) ดังนั้น จึงทำให้ค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตตามทฤษฎีจึงมีค่าเท่ากับ 81.29% สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า การผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF แบบกะที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารไม่ทำให้ค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคส นอกจากนี้ ยังพบว่าอัตราผลผลิตได้จำเพาะ (specific productivity) ที่ได้จากการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 มีค่าเท่ากับ 423 mg/g CDW/h (ตารางที่ 2.1) จากการศึกษาของ Chen et al. (2014) แสดงให้เห็นว่าอัตราผลผลิตได้จำเพาะ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 171 mg/g CDW/h เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* NZN111 เช่นเดียวกับ Sawisit et al. (2015) ที่พบว่าอัตราผลผลิตได้จำเพาะของซักซิเนตซึ่งผลิตจากกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ภายใต้กระบวนการหมักด้วยวิธี SSF แบบกะ มีค่าถึง 235 mg/g CDW/h จากผลการทดลองที่ได้กล่าวในข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 มีศักยภาพสูงที่สุดในการผลิตซักซิเนตจากการใช้ทั้งกลูโคส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธี SSF แบบกะ เมื่อเทียบกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้

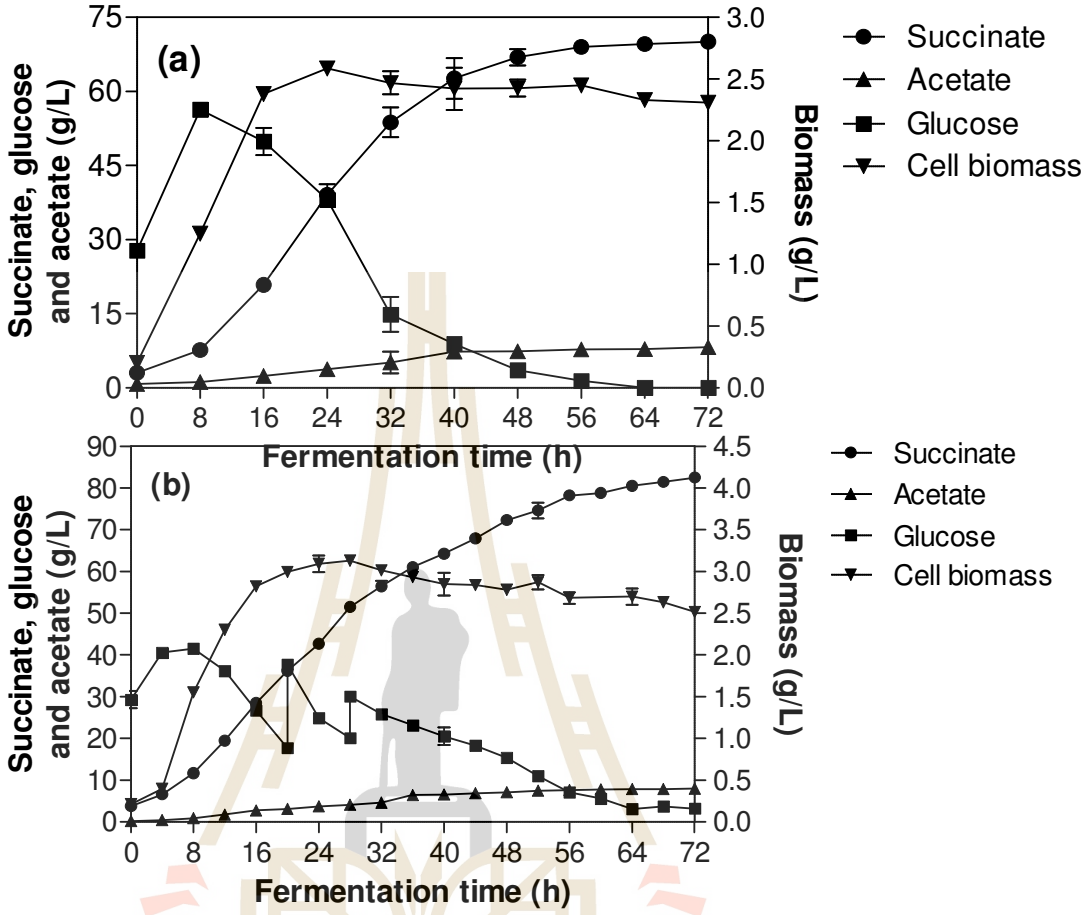
กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น เนื่องจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) และการถ่ายเทความร้อน

(heat transfer) ซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการย่อยและกระบวนการหมักได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้กระบวนหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ (fed-batch SSF process) มีผลช่วยทำให้ค่าผลได้ ค่าอัตราการผลิต และความเข้มข้นของซักซิเนตมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.9% 18.6% และ 18.4% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกระบวนการหมักด้วย SSF แบบกะ (batch SSF process) จากผลการทดลองของ Chen et al. (2011) พบว่าการใช้กระบวนหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ จากกากเรพซีด (rape seed meal) ด้วยเชื้อ *Actinomyces succinogenes* สามารถทำให้ความเข้มข้นของกรดซักซินิกมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 15.5 เป็น 23.4 g/L และมีค่าผลได้เท่ากับ 11.5 g ต่อ 100 g กากเรพซีด รวมทั้งมีอัตราผลผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 0.22 เป็น 0.33 g/L/h ทั้งนี้ Bretz and Kabasci, (2012) ยังได้ศึกษาการเพิ่มค่าผลได้ของซักซิเนต โดยการใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะจากกลูโคสด้วยเชื้อ *An. Succiniciproducens* พบว่าสามารถเพิ่มค่าผลผลิตขึ้นได้จาก 0.60 เป็น 0.88 g/g กลูโคส เมื่อเทียบกับกระบวนการหมักแบบกะที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากัน Sawisit et al. (2015) ยังกล่าวอีกด้วยว่า ความเข้มข้นของซักซิเนตและค่าอัตราผลผลิตเฉลี่ยมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อ *E. coli* KJ122 เมื่อเทียบกับกระบวนการผลิตแบบกะ ฉะนั้น จากผลการทดลองเหล่านี้สามารถยืนยันได้ว่า การใช้กระบวนหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะนั้น สามารถเพิ่มความเข้มข้นของซักซิเนต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับกระบวนหมักด้วย SSF แบบกะ

การศึกษาการผลิตซักซิเนตจากกระบวนหมักด้วย SSF แบบกึ่งกะ ในครั้งนี้ สามารถทำให้ค่าผลได้ของการผลิตซักซิเนตมีค่าสูงถึง 1.03 g/g แป้งมันสำปะหลัง หรือมีค่าเท่ากับ 1.66 mol/mol กลูโคสที่ถูกใช้ ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่าผลผลิตได้ทางทฤษฎีของซักซิเนตมีค่าเท่ากับ 92% Chen et al. (2014) ได้ศึกษาวิธีการผลิตเพื่อให้ได้ซักซิเนตที่มีความเข้มข้นสูง โดยการใช้เซลล์เริ่มต้นของ *E. coli* NZN111 ในปริมาณที่สูง (high cell density culture) และเลี้ยงในอาหารที่อุดมสมบูรณ์ (rich medium) ที่ประกอบไปด้วยแป้งมันสำปะหลังดิบ (cassava powder) และแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) โดยค่าผลผลิตได้ของซักซิเนตที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 0.6 ถึง 0.7 g/g แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับค่าผลผลิตที่ได้การศึกษานี้ (ตารางที่ 2.1) นอกจากนี้ ยังเห็นได้อย่างชัดเจนว่าอัตราการผลิตจำเพาะในระหว่างการผลิตซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังดิบและแป้งมันสำปะหลังของ Chen et al. (2014) มีค่าเพียง 259 และ 339 mg/g CDW/h ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการผลิตจำเพาะของซักซิเนตจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าสูงถึง 456 mg/g CDW/h

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกแป้งมันสำปะหลังเป็นอันดับสามของโลก และสามารถผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ถึง 2 ล้านตันต่อปี (Sriroth et al., 2007) แป้งมันสำปะหลังที่ขายมีราคาถูกมากประมาณกิโลกรัมละ 0.4 ดอลลาร์และเป็นวัตถุดิบที่ไม่ค่อยมีการนำไปใช้สำหรับการบริโภคของมนุษย์ ราคาของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์อะไมเลสตกอยู่ที่กิโลกรัมละ 7.57 และ 3.50 ดอลลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้ราคาจะขึ้นอยู่กับแต่ละผู้ผลิตด้วย รวมถึงราคาของอาหาร AM1 จะอยู่ที่ประมาณลิตรละ 0.42 ดอลลาร์ จากข้อมูลในการศึกษานี้ พบว่าต้นทุนที่ใช้ในการผลิตักซิเนตหนึ่งกิโลกรัมมีค่าใช้จ่ายโดยประมาณ 4.54 ถึง 4.58 ดอลลาร์ อย่างไรก็ตาม ต้นทุนที่ใช้ในการผลิตซักซิเนตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี นั้นมีราคาประมาณกิโลกรัมละ 5.9 ถึง 8.8 ดอลลาร์ เมื่อไม่นานมานี้ Sawisit et al. (2015) ได้รายงานว่าต้นทุนของการผลิตซักซิเนตด้วยกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลังว่ามีราคาประมาณกิโลกรัมละ 5.21 ถึง 5.54 ดอลลาร์ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตซักซิเนตด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 อาจมีศักยภาพในการแข่งขันทางเศรษฐศาสตร์อย่างมาก เมื่อเทียบกับการใช้วัตถุดิบ

ประเภทอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาตกต่ำให้กลายเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าสูงขึ้นได้



รูปที่ 3.13 แสดงระยะเวลาในการหมักแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 เพื่อผลิตซักซิเนตภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ภายใต้สภาวะการผลิต : ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5, ความเร็วในการกวน 200 rpm, และปริมาณเอนไซม์ 500 U AMG/g (แป้งมันสำปะหลัง); (a) กระบวนการ SSF แบบกะ ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้น 70 g/L (b) กระบวนการ SSF แบบกึ่งกะ ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้น 50 g/L; สัญลักษณ์ : วงกลมทึบ (ซักซิเนต), สี่เหลี่ยมทึบ (กลูโคส), สามเหลี่ยมทึบกลับหัว (ชีวมวล) และสามเหลี่ยมทึบ (อะซิเตท)

ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบการผลิตซักซิเนตจากแหล่งเซลลูโลสชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Biomass resource	Microorganism	Mode of process	Succinate (g/L)	Yield[a] (g/100 g substrate)	Productivity[b] (g/L/h)	References
Corn straw	*A. succinogenes* CGMCC1593	Batch SHF	45.5	80.7	0.95	Zheng et al., 2009
		Fed-batch SHF	53.2	82.5	1.21	
Corn stover	*A. succinogenes* CGMCC1593	Batch SSF	47.4	72	0.98	Zheng et al., 2010
Waste bread	*A. succinogeness*	Batch SSF	47.3	55	1.12	Leung et al., 2012
Rapeseed meal	*A. succinogenes* CGMCC1593	Batch SSF	15.5	12.4	0.22	Chen et al., 2011
		Fed-batch SSF	23.4	11.5	0.33	
Corn stalk	*E. coli* SD121 (*ptsG* mutation and *ppc* expression)	Batch SHF	57.81	87	0.96	Wang et al., 2011
Cotton stalk	*A. succinogenes* ATCC 55618	Batch SSF	63	64	1.17	Li et al., 2013
Cassava pulp	*E. coli* KJ122	Batch SHF	41.46	82	0.84	This study
		Batch SSF	80.86	70.34	0.84	
		Fed-batch SSF	98.63	71.64	1.03	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.7 เปรียบเทียบการผลิตซักซิเนตจากวัตถุดิบที่ได้จากมันสำปะหลังในการศึกษานี้กับการศึกษาก่อนหน้านี้

Substrate	Microorganism	Fermentation strategy	Time (h)	Cell concentration (g l^{-1})	Succinate concentration (g l^{-1})	Yield[a] (g g^{-1})	Productivity (g l^{-1} h^{-1})	Specific productivity (mg g^{-1} CDW h^{-1})	References
Cassava powder	*E. coli* NZN111	Fed-batch SSF	73	10.08	106.17	0.66[c]	2.54	258.7	Chen et al. 2014
Cassava starch	*E. coli* NZN111	Fed-batch SSF	73	17.02	127.13	0.71[d]	1.77	339.2	Chen et al. 2014
Cassava pulp	*E. coli* KJ122	Batch SSF	96	3.58	80.86±0.49	0.70±0.37[e]	0.84±0.01	235.3	Sawisit et al. 2014
		Fed-batch SSF		NR[b]	98.63±0.12	0.72±0.97[e]	1.03±0.01	NR	
Cassava starch	*E. coli* KJ122	Batch SSF	72	2.30±0.01	70.08±0.12	1.00±0.01[f]	0.97±0.01	423.3±4.81	This study
		Fed-batch SSF		2.51±0.01	82.46±0.72	1.03±0.01[g]	1.15±0.01	456.3±5.23	

[a] The succinate yield was calculate as product concentration divided by utilizing substrate concentration during fermentation

[b] NR = No reported

[c] The amount of succinate produced from 161.16 g total cassava powder provided during the fermentation

[d] The amount of succinate produced from 178.34 g total cassava starch provided during the fermentation

[e] The amount of succinate produced from 100.00 g total cassava pulp provided during the fermentation

[f] The amount of succinate produced from 70.00 g total cassava starch provided during the fermentation

[g] The amount of succinate produced from 80.00 g total cassava starch provided during the fermentatio

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดที่ทำการทดสอบไม่ว่าจะเป็น น้ำตาลกลูโคส มอลโทส แมนโนส กาแล็คโทส อะราบิโนส และไซโลส แต่อัตราเร็วในการใช้น้ำตาลและความสามารถในการผลิตซักซิเนตจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของน้ำตาลนั้นๆ โดยกรณีของน้ำตาลไซโลสจะมีอัตราการใช้ช้าที่สุด ส่วนน้ำตาลที่ให้ค่าอัตราผลผลิตสูงสุด คือ น้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของซักซิเนต ค่าผลผลิตได้ และค่าอัตราผลผลิตที่ได้จากการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อ *E. coli* KJ122 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายต้นทุนต่ำ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ ที่ถูกตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 3.6 และตารางที่ 3.7) นอกจากนี้การเจริญและการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* KJ122 เกิดขึ้นในขั้นตอนเดียว โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะอย่างง่าย ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ไม่จำเป็นต้องเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในถังหมัก ซึ่งจะควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ด้วยสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมคาร์บอเนตและโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งคาดหวังว่าสภาวะการหมักดังที่กล่าวในข้างต้น จะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตซักซิเนต การทำบริสุทธิ์ และการกำจัดของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตซักซิเนตลงได้ ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 เป็นเชื้อจุลินทรีย์อีกหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตซักซิเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้กากมันสำปะหลังหรือแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลัก ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 เป็นเชื้อจุลินทรีย์อีกหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตซักซิเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิต

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตซักซักซิเนตในการศึกษานี้ ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยวัตถุดิบประเภทแป้งและเส้นใยของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ ฉะนั้นการศึกษานี้จึงต้องมีการเติมเอนไซม์ทางการค้า (commercial enzymes) ให้เกิดกระบวนการย่อยวัตถุดิบดังกล่าว เพื่อให้ได้น้ำตาลที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทั้งนี้เอนไซม์ทางการค้าที่ใช้มีราคาที่สูง การลดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลังหรือแป้งมันสำปะหลังลงจึงอาจช่วยทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตลงได้ ดังนั้นจะต้องมีการศึกษากลยุทธ์ที่ใช้ในการลดปริมาณเอนไซม์ และหาอัตราส่วนของสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตร่วมกับการปรับปรุงให้ความเข้มข้นของซักซิเนต ค่าผลได้ และค่าอัตราผลผลิตมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย

อุปสรรค

เนื่องจากการใช้กากมันสำปะหลัง ที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ไม่ละลายน้ำ เป็นวัตถุดิบในการหมัก จึงส่งผลให้การวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ค่อนข้างยุ่งยาก และได้ค่าความแม่นยำค่อนต่ำ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหารแข็ง แล้วนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารแข็ง และรายงานปริมาณเชื้อในรูปของ CFU/mL อย่างไรก็ดี การวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวนี้ มีข้อคำนึงอยู่เล็กน้อย คือจะต้องทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ให้ดี เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์บางส่วนอาจเกาะที่พื้นผิวของกากมันสำปะหลัง ทำให้ความแม่นยำในการวิเคราะห์ลดลงได้

บรรณานุกรม

Agarwal L, Isar J, Meghwanshi GK and Saxena RK. 2006. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. Appl Microbiol 100:1348–1354.

Ahmed I, Morris D. 1994. Replacing petrochemical with biochemicals. Institute for Local Reliance, Washington, DC.

Anastas P, Warner J. 1998. Green Chemistry: Theory and Practice. London, UK: Oxford University Press.

Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. 2007. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol Prog 23:381–388

AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15th edn. Association of official Analytical Chemists, Washington

Balat M. 2007. Global bio-fuel processing and production trends. Energy Explor Exploit 25:195–218.

Beauprez JJ, De Mey M and Soetaert WK. 2010. Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers. Process Biochem 45:1103–1114.

Booth IR. 2005. Glycerol and methylglyoxal metabolism. In: Curtis, III, R., et al. (Eds), EcoSal-*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC (Chapter 3.4.3). http://www.ecosal.org.

Bouvet OM, Lenormand P, Carlier P, Grimont PA. 1995. Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the *Enterobacteriacea*. Res Microbiol 146:279-290.

Bretz K and Kabasci S. 2012. Feed-control development for succinic acid production with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Biotechnol Bioeng 109:1187–1192.

Bryant MP, Small N. 1956. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. J Bacteriol 72:22-26.

Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A, Alfani F. 2004. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. Biotechnol Prog 20:200–206

Carta FS, Soccol CR, Ramos LP, Fontana JD. 1999. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. Bioresour Technol 68:23-28

Chan S, Kanchanatawee S and Jantama K. 2012. Production of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli*. Bioresource Technol 103:329–336.

Charles AL, Sriroth K, and Huang T. 2005. Proximate composition, mineral contents, hydrogen cyanide and phytic acid of 5 cassava genotypes. Food Chemistry 92: 615-620.

Chen C, Ding S, Wang D, Li Z and Ye Q. 2014. Simultaneous saccharification and fermentation

of cassava to succinic acid by *Escherichia coli* NZN111. Bioresource Technol 163:100–105.

Chen K, Zhang H,Miao Y,Wei P and Chen J. 2011. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rapeseed meal of succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. Enzyme Microbial Technol 48:339–344.

Choi G, Kang H, Moon S and Chung B. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of sludge-containing cassava mash for batch and repeated batch production of bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321. J Chem Technol Biotechnol 84:547–553.

Deidman JD, Smith JA, and Struhl K, editors. Recombineering: Genetic engineering in bacteria using homologous recombination. New York: John Wiley & Sons. p 1.16.1-1.16.21.

Du C, Lin SKC, Koutinas A, Wang R and Webb C. 2007. Succinic acid production from wheat using a biorefining strategy. Appl Microbiol Biotechnol 76:1263–1270.

Fotadar U, Zaveloff P and Terracio L. 2005. Growth of Escherichia coli at elevated temperatures. J BasicMicrobiol 45:403–404.

Gokarn RR, Eiteman MA, Martin SA, Eriksson KEL. 1997. Production of succinate from glucose, cellobiose, and various cellulosic materials by the ruminant anaerobic bacteria Fibrobacter succinogenes and *Ruminococcus flavefaciens*. Appl Biochem Biotechno 68:69–80

Guettler MV, RumlerDand Jain MK. 1999. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J System Bacteriol 49:207–216.

Hatti-Kaul R, Tornvall U, Gustafsson L, Borjesson P. 2007. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals-a cradle-to-grave perspective. Trends in Biotechnol 25(3):119-124.

Hgren K, Rudolf A, Galbe M and Larsson S. 2006. Fuel ethanol production from steam pretreated corn stover using SSF at high dry matter concentration. Biomass Bioenergy 30:865–869.

Ishida Y, Kori A, Ishihama A. 2009. Participation of regulator AscG of the b-glucoside utilization operon in regulation of the propionate catabolism operon. J Bacteriol 191:6136–6144

Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. 2007. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. Biotechnol Bioeng 99(5):1140-1153.

Jantama K, Zhang X, Moore JC, Svoronos SA, Shanmugam KT, Ingram LO. 2008. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C**.** Biotechnol Bioeng. 101(5):881-893.

Jesse TW, Ezeji TC, Qureshi N, and Blaschek HP 2002. Production of butanol from starch-

based waste packing peanuts and agricultural waste. J Ind Microbiol Biotechnol. 29: 117-123.

Jiang M, Wan Q, Liu R, Liang L, Chen X, Wu M, Zhang H, Chen K, Ma J, Wei P, Ouyang P. 2014. Succinic acid production from corn stalk hydrolysate in an *E. coli* mutant generated by atmospheric and room-temperature plasmas and metabolic evolution strategies. J Ind Microbiol Biotechnol 41:115–123

Lee SJ, Song H and Lee SY. (2006). Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. Biotechnol Bioeng 98:1296–1304.

Leung CCJ, Cheung ASY, Zhang AYZ, Lam KF, Lin CSK. 2012. Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. Biochem Eng J 65:10–15

Li Q, Lei J, Zhang R, Li J, Xing J, Gao F, Gong F, Yan X, Wang D, Su Z, Ma G. 2013. Efficient decolorization and deproteinization using uniform polymer microspheres in the succinic acid biorefinery from bio-waste cotton (*Gossypium hirsutum* L.) stalks. Bioresour Technol 135:604–609

Liew ST, Arbakariya LST, Rosfarizan M and Raha AR. 2006. Production of solvent (acetone-butanol-ethanol) in continuous fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 using gelatinized sago starch as a carbon source. J Microbiol 2:41–50.

Liu YP, Zheng P, Sun ZH, Ni Y, Dong JJ, Zhu LL. 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresour Technol 99:1736–1742

Lu Y, Ding Y andWu Q. 2011. Simultaneous saccharification of cassava starch and fermentation of algae for biodiesel production. Appl Phycol 23:115–121.

Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW and Ingram LO. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. Biotechnol Lett 29:397–404.

Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW and Ingram LO. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. Biotechnol Lett 29:397–404.

Martinez I, Lee A, Bennett GN and San KY. 2011. Culture conditions' impact on succinate production by a high succinate producing *Escherichia coli* strain. J Biotechnol 27:1225–1231.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31:426–428.

Moreno AD, Ibarra D, Ballesteros I, Gonzalez A, and Ballesteros M. 2013. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. Bioresource Technology. 135: 239-245.

Nitayavardhana S, Shrestha P, Rasmussen ML, Lamsal BP and Leeuwen JH. 2010. Ultrasound improved ethanol fermentation from cassava chips in cassava-based ethanol plants.

Bioresource Technol 101:2741–2747.

Nordhoff S, Hocker H, Gebhardt H. 2007. Renewable resources in the chemical industry-Breaking away from oil? Biotechnol J 2:1505-1513.

Ohgren K, Rudolf A, Galbe M and Larsson S. 2006. Fuel ethanol production from steam pretreated corn stover using SSF at high dry matter concentration. Biomass Bioenergy 30:865–869.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT, Vandenberghe LPS, Mohan R. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. Bioresour Technol 74:81–87

Rattanachomsri U, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L, Champreda V. 2009. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. J Biosci Bioeng 107:488–493

Sassner P, Galbe M and Zacchi G. 2006. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated salix at high dry-matter content. Enzyme Microbial Technol 39:756–762.

Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends in Biotechnol 26(2):100-108.

Sawisit A, Jantama SS, Kanchanatawee S and Jantama K. 2015. Efficient utilization of cassava pulp for succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* KJ122. Bioprocess Biosyst Eng 38:175–187.

Song H, Kim T, Choi SJ, Nielsen LK and Chang HN. 2008. Development of chemically defined medium for *Mannheimia succiniciproducens* based on its genome sequence. Appl Microbiol Biotechnol 79:263–272.

Sriroth K, Piyachomkwan K,Wanlapatit S and Oates CG. 2000. Cassava starch technology: the Thai experience. Starch-St.rke 52:439–449.

Tango MSA and Ghaly AE. 1999. Kinetic modeling of lactic acid production from batch submerged fermentation of cheese whey. Trans ASAE 42:1791–1800.

Thanaseelaan V. 2013. Proximate analysis, mineral and amino acid profiles of de oiled rapeseed meal. Int J Food Agric Vet Sci 3:66–69

Thang VH, Kanda K and Kobayashi G. 2010. Production of acetone– butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Appl Biochem Biotechnol 161:157–170.

Thomason L, Court DL, Bubunenko M, Constantino N, Wilson H, Datta S, Oppenheim 2005. Current Protocols in Molecular Biology. In Ausubel FM, Brent R, Klingston RE, Moore DD, Deidman JD, Smith JA, and Struhl K, editors. Recombineering: Genetic engineering in bacteria using homologous recombination. New York: John Wiley & Sons. p 1.16.1-1.16.21.

Thongchul N, Navankasattusas S, and Yang ST. 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. Bioprocess and Biosystems Engineering. 33: 407-416.

Vadivel V, and Janardhanan K. 2001. Diversity in nutritional composition of wild jack bean (*Canavalia ensiformis* L. DC) seed collected from South India. Food Chemistry. 74: 507-511.

Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG. 1997. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. Arch Microbiol 167:332–342

Virunanona C, Ouephanit C, Burapatana V, Chulalaksananukul W. 2013. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. J Clean Prod 39:273–279

Wang D, Li Q, Yang M, Zhang Y, Su Z, Xing J. 2011. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation. Process Biochem 46:365–371

Wang L, Zhao B, Liu B, Yang C, Yu B, Li Q, Ma C, Xu P, Ma Y. 2010. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. Bioresource Technol 101:7895–7901.

Werpy T, Frye J and Holladay J, 2006. Succinic acid – a model building block for chemical production from renewable resources, in Biorefineries–Industrial Processes and Products: Status and Future Directions, ed by Kamm B, Gruber PR and Kamm M. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany 367–379.

Yazdani SS, Gonzales R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Curr Opin Biotechnol 18:213-219.

Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. Appl Microbiol Biotechnol 51:545–552

Zhang X, Jantama K, Moore JC, Jarboe LR, Shanmugam KT, Ingram LO. 2009. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. Natl Acad Sci USA, Proc

Zheng P, Dong JJ, Sun ZH, Ni Y, Fang L. 2009. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresour Technol 100:2425–2429

Zheng P, Fang L, Xu Y, Dong JJ, Ni Y and Sun ZH. 2010. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. Bioresource Technol 101:7889–7894.

Zhu M, Li P, Gong X and Wang J. 2012. A comparison of the production of ethanol between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using unpretreated cassava pulp and enzyme cocktail. J Biosci Biotechnol Biochem 4:671–678.

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ (ภาษาไทย)** นายเขมวิทย์ จันต๊ะมา
   (ภาษาอังกฤษ) Mr. KAEMWICH JANTAMA
   เลขหมายประจำตัวประชาชน 3501900644622
2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**
   รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
   สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**
   สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี
   อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
   โทรศัพท์ 044-22 4562; โทรสาร 044-22 4150, 044-22 4154
   E-mail: kaemwich@sut.ac.th
4. **ประวัติการศึกษา**

ระดับการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถานศึกษา	วิชาเอก
ปริญญาตรี	2541	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Chiang Mai University)	วิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีอาหาร (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) B.Sc. (Food Science and Technology)
ปริญญาโท	2544	มหาวิทยาลัยมหิดล (Mahidol University)	อณูพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ M.Sc. (Molecular Genetics and Genetic Engineering)
ปริญญาโท	2547	University of Florida, USA	วิศวกรรมเคมี M.E. (Chemical Engineering)
ปริญญาเอก	2551	University of Florida, USA	วิศวกรรมเคมี Ph.D. (Chemical Engineering)

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   Metabolic Engineering and Evolution, Fermentation Technology, Molecular Genetics and Genetic Engineering, and Protein Expression
6. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น**
   - **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : ชื่อแผนงานวิจัย ... การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล และการแยกบริสุทธิ์.....

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

○ **หัวหน้าโครงการวิจัย** :

ชื่อโครงการวิจัย *วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ Klebsiella oxytoca เพื่อผลิตกรดซักซินิกบริสุทธิ์*

ชื่อโครงการวิจัย Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media

ชื่อโครงการวิจัย การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*

ชื่อโครงการวิจัย การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเด็กซ์ทรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย ด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacullus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากชานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซักซินิก

○ **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :**

ชื่อโครงการวิจัย *วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ Klebsiella oxytoca เพื่อผลิตกรดซักซินิกบริสุทธิ์*
แหล่งทุน: *มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*

ชื่อโครงการวิจัย การดัดแปลงเมทาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก
แหล่งทุน: *สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ*

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากชานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซักซินิก
แหล่งทุน: *โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก)*

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก
แหล่งทุน: *โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก)*

ชื่อโครงการวิจัย Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media
แหล่งทุน: *มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย
แหล่งทุน: *สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย*

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*
แหล่งทุน: *สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ*

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกจากกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง
แหล่งทุน: *สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ*

ชื่อโครงการวิจัย การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเดรกซ์ตรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลายด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ
แหล่งทุน: *สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี