รหัสโครงการ SUT 1-104-43-36-12

รายงานการวิจัย

การสำรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตกรด ไฮดรอกซี ซิตริก

A Survey of Bacteria Producing Hydroxy Citric Acid

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 1-104-43-36-12

รายงานการวิจัย

การสำรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตกรด ไฮดรอกซี ซิตริก

A Survey of Bacteria Producing Hydroxy Citric Acid

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิโชค แสงโสดา

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2543-2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2548

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในการดำเนินการวิจัย และการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ผู้วิจัย

กันยายน 2548

บทคัดย่อภาษาไทย

การทดลองนี้ได้พัฒนาการแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียที่หลั่งกรดไฮดรอกซีซิตริกจากแบคทีเรียที่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกในเส้นทางชีวเคมีในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยตรวจหาโคโลนีดังกล่าวที่เห็นได้บนจานอาหาร วิธีการนี้อาศัยคุณลักษณะสีแดงอันเกิดจากปฏิกิริยาจำเพาะและเป็นเอกลักษณ์ระหว่างโซเดียม เมตาวานาเดทและกรดไฮดรอกซีซิตริกในสารละลายกรดซัลฟูริก โคโลนีที่ล้อมรอบด้วยวงสีแดง จะถือว่าเป็นผู้ผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริก

แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่แยกจากปลาส้มจากตลาดสดในเขตอำเภอเมืองนครราชสีมา ซึ่งตั้งชื่อ FFB9และ FFB12 เลี้ยงในอาหารเหลวขั้นต่ำ ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 54 ชั่วโมงสามารถสร้างกรดไฮดรอกซีซิตริกซึ่งตรวจหาความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีซิตริกในน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการวัดสเปคโตรโฟโตที่ช่วงคลื่น467 นาโนเมตรได้สูงถึง 24.48 และ 13.37 มก./มล. ตามลำดับ

Abstract

A method was developed for detection and isolation, within bacteria having hydroxycitric acid(HCA) in their biochemical pathways, of strains secreting the HCA; the visual detection of colonies of these particular strains can be carried out directly on agar plates. The method is based on the characteristic reddish color resulting from the specific and unique interaction of sodium meta vanadate and HCA in aqueous sulfuric acid solution. The colonies circled by a red halo were presumed to be producers of hydroxycitric acid.

Two isolates of bacteria, designed strains FFB9 and FFB12 were isolated from *Plasom* (Thai low-salt fermented fish product) samples collected in a fresh market in Muang district region of Nakorn Ratchasima, grown in liquid minimal medium in condition at 30 °C for 54 hours and producing HCA quantitated spectrophotometrically at 467 nm up to 24.48 and 13.37 mg/ml respectively in their cultured media.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	6
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดไฮดรอกซีซิตริก	7
การสร้างกราฟมาตราฐานเพื่อหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกโดยSpectrophotometer	8
การผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกจากแบคทีเรีย	8
การเตรียมน้ำเลี้ยงเพื่อวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก	9
บทที่ 3 ผลการวิจัย	10
อภิปรายผล	20
บทที่ 4 บทสรุป	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	24
ภาคผนวก ข	26
ภาคผนวก ค	27
ภาคผนวก ง	28

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงการทำงานของ HCA	1
รูปที่ 2	แสดงไอโซเมอร์ 4 แบบ ของ HCA	2
รูปที่ 3	แสดงช่อง50ช่องโคโลนีตามตารางแม่แบบที่วางใต้จานอาหาร	7
รูปที่ 4	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย SB1-SB10	12
รูปที่ 5	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย SB1-SB10 หลังจากเทสารละลาย1 N H_2SO_4	12
รูปที่ 6	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1-FFB15	13
รูปที่ 7	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1-FFB15 หลังจากเทสารละลาย1 N H_2SO_4	13
รูปที่ 8	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1(บน) FFB9(ล่าง)	14
รูปที่ 9	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1(บน) FFB9(ล่าง) หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4	14
รูปที่ 10	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1(บน) FFB12(ล่าง)	15
รูปที่ 11	แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1(บน) FFB12(ล่าง) หลังจากเทสาร ละลาย1 N H_2SO_4	15
รูปกราฟที่1	แสดงกราฟมาตราฐานในการหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก	11
รูปกราฟที่ 2	แสดงความขุ่นของเซลล์ หรือการเจริญของเซลล์ แบคทีเรีย(OD_{620}) และ ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก(OD_{467})ของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB9	17
รูป กราฟที่ 3	แสดงความขุ่นของเซลล์ หรือการเจริญของเซลล์ แบคทีเรีย(OD_{620})และ ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก(OD_{467})ของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB12	19

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงผลการทำกราฟมาตราฐานการหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก 10
ตารางที่ 2 แสดงความขุ่นของเซลล์ และการดูดกลืนของแสงที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB9 16
ตารางที่ 3 แสดงความขุ่นของเซลล์ และการดูดกลืนของแสงที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB12 18

สารบัญ(ต่อ)

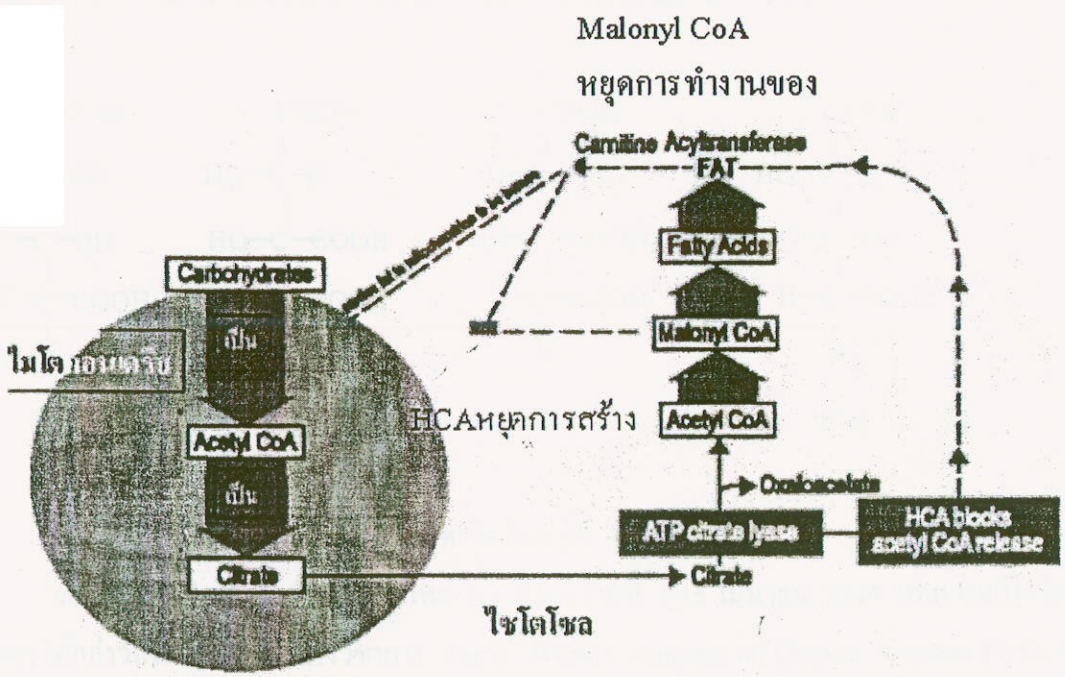
	หน้า
ประวัติผู้วิจัย	31

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ตามรายงานปรากฏว่าโรคอ้วนทำให้ประชาชนชาวไทยสูญเสียเงินสั่งยารักษาโรคเรื้อรังจากโรคอ้วนถึงปีละ 2 แสนล้านบาท (1) ไคโตแซน (chitosan) ในสินค้า Liposorb ฯลฯ ไกลโคแมนแนน (glycomannan) จากหัวบุกและกรดไฮดรอกซีซิตริกจากส้มแขก (*Garcinia cambogia* แฟมิลี Guttiferae) ในสินค้า Hi-Sol ต่างเป็นตัวอย่างของสารที่นำมาลดไขมันในร่างกาย

ส้มแขก เป็นพืชสมุนไพรเกี่ยวกับการลดน้ำหนัก เป็นผลไม้แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีสาร Hydroxycitric acid (HCA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญอยู่เป็นจำนวนมาก สารตัวนี้มีความสำคัญเกี่ยวกับการกดความอยากอาหารและเพิ่มความร้อนภายในร่างกายโดยการเผาผลาญไขมัน หยุดกระบวนการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตไปสะสมในรูปของไขมัน มีผลลดการผลิตกรดไขมันและคอเลสเตอรอล การเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นไขมันสะสมในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

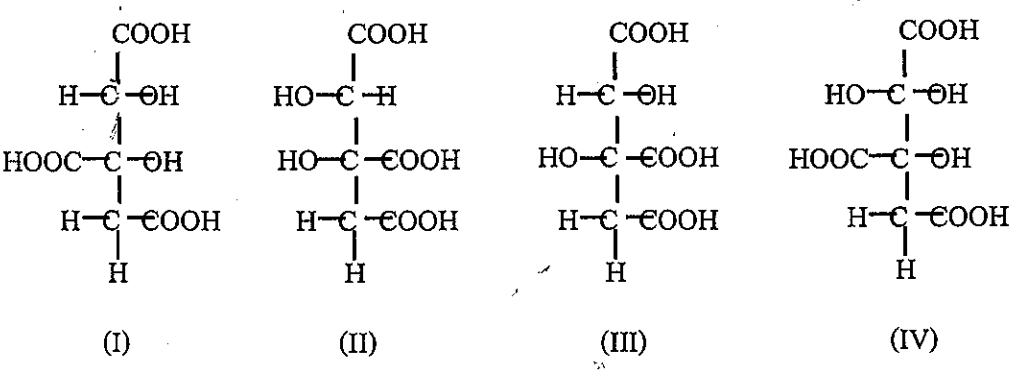


รูปที่ 1 แสดงการทำงานของ HCA ขัดขวางการทำงานของ ATP citrate lyase หยุดการสร้าง Acetyl CoA ทำให้มี Malonyl CoAน้อย ไม่ขัดขวางการทำงานของ Carnitine acyltransferase ซึ่งทำให้มีการเผาผลาญใช้ไขมันที่สะสมไว้

กระทำโดยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (EC 4.1.3.8) ปรากฏว่า (-) -Hydroxycitrate เป็นตัวยับยั้งโดยตรง (specific inhibitor) ของเอนไซม์ดังกล่าว (2,4-13) ไขมันสะสมจึงลดลง เมื่อร่างกายสร้างไกลโคเจนในปริมาณที่เพียงพอแล้วจะมีกลไกบางอย่างไปกระตุ้นศูนย์ควบคุมความอิ่มส่งไปยังสมองทำให้เรารู้สึกอิ่ม ทำให้ลดการบริโภคอาหารที่มากเกินความจำเป็น สาร HCA แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนักอย่างอื่นโดยไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยตรง แต่จะใช้กลไกธรรมชาติที่กล่าวมาลดไขมัน

จากอินเตอร์เนท พบว่า มีประกาศโฆษณาขายผลิตภัณฑ์ลดความอ้วน ที่ประกอบด้วย HCA มากกว่า 300 แห่ง แม้ส้มแขกจะถูกนำมาเป็นผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้เป็นอย่างดีและไม่ได้ขาดแคลน แต่ขบวนการดังกล่าวทำให้ราคาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีราคาแพง

Rao และ ผู้ร่วมงาน (1966) ได้รายงานขบวนการชีวเคมีของ Hydroxycitric acid ใน *Micrococcus* (3) จากรายงานดังกล่าวได้อธิบายถึง กรดไฮดอกซีซิตริกมีไอโซเมอร์ (isomers) 4 แบบ (ดูรูป) แบบที่ 2 (II) พบในส้มแขก แบบที่ 4 (IV) พบในพืชใกล้กับพวกชบา (*Hibiscus sabdarifla*) และ *Micrococcus* ที่แยกมาได้มีเส้นทาง (pathway) กระบวนการชีวเคมีที่มี HCA แบบที่ 2 (II) เช่นเดียวกับ HCA ในส้มแขก การวิจัยนี้จะแยกแบคทีเรียจากดินในท้องถิ่น (นครราชสีมา) ที่มีเส้นทางกระบวนการชีวเคมีที่ใช้ HCA แบบที่ 2 (II) การคัดเลือกแบคทีเรียเหล่านี้กระทำโดยใช้ HCA แบบที่ 2 (II) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 2 แสดงไอโซเมอร์ 4 แบบ ของ HCA

จากวารสารไทยแลนด์:เมดิคอลไทม์ (2) ประจำวันที่ 1-15 เมษายน 2544 บทความเปิดโลกสมุนไพรได้กล่าวถึงการสัมมนาทางวิชาการ The 8th World Conggress on Clinical Nutrition (WCCN) หรือการประชุมสภาโภชนาการทางคลินิกของโลกครั้งที่ 8 ที่โรงแรมอัมรินทร์ลากูน จ. พิษณุโลก ซึ่งเป็นงานประชุมสัมมนาทางวิชาการ เพื่อนำเสนอผลงานวิจัยทางคลินิกด้านโภชนาการที่มีผลต่อสุขภาพที่สำคัญของโลก มีผู้เข้าร่วมการสัมมนาจากหลายประเทศรวม 300 คน อาทิ สหรัฐอเมริกา อังกฤษ

ออสเตรเลีย แคนาดา อินเดีย จัดโดยอินเตอร์เนชั่นแนล คลินิกคอล นูทริชั่น (INC) ร่วมกับ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

คณะนักวิจัยจากโรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล นำโดยศ.พญ. จุฬาภรณ์ รุ่งพิสุทธิพงษ์, ดร. อรวรรณ ภู่ไชยวัฒนานนท์, ดร.ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์ และ รุ่งทิวา การตะวัน นำเสนอผลงานการวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับการลดไขมันส่วนเกินของสตรีด้วยแคลเซียมไฮดรอกซีซิตริก แอสิด (HCA) ที่ละลายน้ำจากเทคโนโลยีของนักวิทยาศาสตร์ไทย

ผลงานวิจัยทางคลินิกนี้ นับเป็นการนำเสนอความก้าวหน้าที่สำคัญอีกขั้นหนึ่งด้านโภชนาการเพื่อสุขภาพ และเพื่อวงการความงามของไทย รวมทั้งนานาชาติ โดยเฉพาะปัญหาการมีไขมันส่วนเกินสะสมในร่างกายมากเกินไป และภาวการณ์เกิดโรคอ้วน' ศ.พญ.จุฬาภรณ์ รายงานผลการวิจัยทางคลินิกว่า ผลการทดสอบสูตรสารสกัดของนักวิทยาศาสตร์ไทยที่เกิดขึ้นจากการทดลองในครั้งนี้ เริ่มจากปรับปรุงคุณภาพของไฮดรอกซีซิตริกแอสิด (HCA) ให้สามารถเพิ่มความเพรียวของร่างกายได้อย่างแน่นอน ด้วยการสกัด HCA จากผลส้มแขกที่ใช้กระบวนการเฉพาะทางวิทยาศาสตร์ แล้วปรับให้อยู่ในสูตรซุปเปอร์ ไฮ-โซล ซึ่งเป็นเกลือแคลเซียมละลายน้ำได้ดีที่มี HCA อยู่ 70% แล้วนำไปบรรจุในซอง โดยแต่ละซองมีซูเปอร์ ไฮ-โซล อยู่ 1.65 กรัม (เทียบเท่ากับ HCA 1.15 กรัม) สตรีอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการทดลองและเป็นผู้ที่มีดัชนีมวลกายมากกว่า 25 กก./ม. (ดัชนีมวลกายเท่ากับน้ำหนักหารด้วยส่วนสูงเป็นเมตรยกกำลังสอง) รวมจำนวน 42 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมี 23 คน มีอายุเฉลี่ย 40 ปี รับประทานอาหารที่ให้พลังงาน 1,000 แคลอรี่ต่อวัน ตามคำแนะนำและละลายซูเปอร์ ไฮ-โซลกับน้ำดื่มก่อนอาหารครั้งละซอง วันละ 3 ครั้ง กลุ่มที่สอง มี 19 คน มีอายุเฉลี่ย 35.6 ปี รับประทานอาหารลักษณะเดียวกัน และละลายยาหลอกกับน้ำดื่มก่อนอาหารครั้งละซอง วันละ 3 ครั้ง ก่อนการทดลองกลุ่มแรกที่ใช้ซูเปอร์ ไฮ-โซล มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 69 กก. และกลุ่มที่สองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 65.5 ในเวลา 2 เดือนต่อมาหลังจากทดลอง กลุ่มแรกลดน้ำหนักตัวลงได้มากกว่าและรวดเร็วกว่ากลุ่มที่สองอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดระยะเวลาการทดลองน้ำหนักที่ลดลงเกิดจากการหายไปของไขมันสะสมซึ่งเห็นได้จากการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ไขมันที่ลดลงทำให้น้ำหนักตัวลดลง 3.9% และดัชนีมวลกายลดลง 3.27 % ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลง 23.2 % ในขณะที่ความเสี่ยงต่ออาการไขมันอุดตันในเส้นเลือดลดลงอย่างชัดเจน เมื่อสิ้นสุดการทดสอบปริมาณของสารชีวเคมีในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม ทำให้สรุปได้ว่าไม่มีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ จากการใช้ซูเปอร์ ไฮ-โซล นอกจากนี้กรดยูริกซึ่งเป็นต้นเหตุของโรคเกาต์ยังลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะเดียวกัน กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ไทยนำโดย ศ. ดร.พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา จากเอเชี่ยนนูทราซูติคอล เซ็นเตอร์ (ANC) ผู้พัฒนาสูตรซูเปอร์ ไฮ-โซล ได้ทำการทดลองการใช้ซูเปอร์ ไฮ-โซล กับอาสาสมัครสตรีอีกกลุ่มหนึ่งจำนวน 41 คน อายุ 20-30 ปี ที่มีดัชนีมวลกายเกินกว่า 18 กก./ม. ใช้ซองบรรจุซูเปอร์ ไฮ-โซล 1.65 กรัม เช่นเดียวกัน ละลายน้ำดื่ม

ก่อนอาหารครั้งละซอง ตลอดระยะเวลาของการประเมินที่นาน 9 สัปดาห์ โดยอาสาสมัครที่มีน้ำหนักตัว ไม่เกิน 60 กก. ใช้วันละ 2 ครั้ง ผู้ที่มีน้ำหนักตัวมากกว่า 60 กก. ใช้วันละ 3 ครั้ง และให้อาสาสมัครทุกคนจะต้องออกกำลังกายสัปดาห์ละครั้ง

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาประเมินผล ปรากฏว่า ค่าเฉลี่ยของส่วนประกอบและสัดส่วนของร่างกายลดลงอย่างมีนัยสำคัญชัดเจนดังต่อไปนี้ น้ำหนักตัว 3.6% ดัชนีมวลกายลดลง 3.55% ไขมันร่างกาย 5.48% เส้นรอบต้นแขนซ้าย 7.74 % เส้นรอบต้นแขนขวา 6.87 % เส้นรอบอก 2.62% เส้นรอบใต้อก 3.63% การทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงการลดลงอย่างชัดเจนของไขมันส่วนเกินโดยเฉพาะบริเวณสัดส่วนที่ผู้หญิงต้องการให้ลดลง เช่น เส้นรอบเอวลดลง 4.09% เส้นรอบสะโพกลดลง 4.29% เส้นรอบต้นขาซ้ายลดลง 4.5% เส้นรอบต้นขาขวาลดลง 5.48 % ตลอดระยะเวลาการประเมินผล ไม่มีผลข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นกับอาสาสมัครเลย ทำให้สรุปได้ว่าซูเปอร์ ไฮ-โซล สามารถทำให้ร่างกายเพรียวขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย ไร้ผลข้างเคียง

Shara และผู้ร่วมงาน (2004) ได้แสดงให้เห็นว่าเกลือแคลเซียม-โปตัสเซียมของ HCA ที่ได้จากส้มแขก (*Garcinia cambogia* : HCA-SX, Super CitriMax) มีผลในการจัดการน้ำหนัก ผลการทดลองยืนยันว่า HCA-SX ส่งเสริมการเผาผลาญไขมัน (fat oxidation) เพิ่มการหลั่ง serotonin ทำให้ระดับปริมาณลิปิดอยู่ในระดับปกติ และลดปริมาณ leptinในซีรั่มของคนอ้วน

แบคทีเรียบางชนิดสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ แต่จุลินทรีย์หลายประเภท เช่น เห็ดที่ไม่เป็นพิษหลายชนิดใช้เป็นแหล่งอาหาร แบคทีเรียบางพวกสร้างกรดน้ำส้ม กรดแลคติก และกรดอะมิโน เช่น ผงชูรส เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย แบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาททำให้อาหารมีรสเปรี้ยวหรือมีรสชาติที่ดีขึ้น พบได้ในอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิด เช่น น้ำปลา บูดู ซีอิ๊ว ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม หอยดอง แหนม หม่ำ ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาส้ม ส้มฟัก ปลาเจ่า ผักกาดดอง หอมดอง ใบเมี่ยงหมัก และข้าวหมาก ฯลฯ โดยเฉพาะอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือต่ำจะมีรสเปรี้ยวมากทำให้ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างแท่งคือ แลคโตบาซิลลัส เพนโตซัส และแลคโตบาซิลลัส แพลนตารัม และพวกรูปร่างกลม เพดโอคอกคัส เพนโตซาเซียส ส่วนในอาหารหมักที่มีเกลือสูง เช่น น้ำปลา บูดู และซีอิ๊วมีกรดน้อย แต่ก็พบแบคทีเรียกกรดแลคติก สกุลเตทตราจีโนคอคคัส อย่างไรก็ตามอาหารหมักที่มีเกลือสูงแต่ยังมี รสเปรี้ยว เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม และกุ้งจ่อม ก็พบแลคโตบาซิลลัสหลายชนิด

แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดใหม่ การศึกษาแบคทีเรียซึ่งมีขนาดเล็กทำได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชและสัตว์ซึ่งมีขนาดใหญ่และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เห็นความแตกต่างชัดเจน รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์และคณะ (2543) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ค้น

พบแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดใหม่ 2 ชนิด จากปลาร้าและปลาจ่อม คือเชื้อที่มีรูปร่างแท่ง จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยตั้งชื่อว่า แลคโตบาซิลลัส แอซิดิพิสซิส (*Lactobacillus acidipiscis*) และเชื้อรูปร่างกลม จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยตั้งชื่อว่า ไวสเซลลาไทยแลนเดนซิส (*Veissella thailandensis*) จากทุนสนับสนุนการตีพิมพ์ผลงานวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เชื้อแลคโตบาซิลลัสที่พบใหม่มีคุณสมบัติที่ดีคือทนเกลือได้สูง และสร้างกรดแลคติกชนิดแอลไอโซเมอร์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิดใหม่ สแตพฟิลโลคอคคัส พิสซิเฟอร์เมนแทน (*Staphylococcus piscifermentaus*) จากปลาร้า

แบคทีเรียกรดแลคติกกับสุขภาพ แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดจะทำให้อาหารมีรสเปรี้ยวแต่ไม่มีผลต่อสุขภาพ เชื้อแลคโตบาซิลลัสและไบฟิโตแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่มีบทบาทในลำไส้ ซึ่งจะมีผลต่อสุขภาพ มีรายงานว่าการบริโภคใยอาหาร เช่น ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบในหอมหัวใหญ่และกล้วย จะช่วยเพิ่มปริมาณไบฟิโดแบคทีเรีย เป็นผลให้ช่วยลดคอเลสเตอรอล ไตรกรีเซอไรด์ กลูโคสในเลือด ลดความดัน แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกชัดเจน การวิจัยนี้จะแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นบ้านเช่น ปลาส้ม ปลาเจ่า (จากตลาดในอำเภอเมืองนครราชสีมา) ที่มีเส้นทางกระบวนการชีวเคมีที่ใช้ HCA แบบที่ 2 (II) ด้วย การคัดเลือกแบคทีเรียเหล่านี้กระทำโดยใช้ HCA แบบที่ 2 (II) เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นกัน

Antony และผู้ร่วมงาน (1999) ได้เสนอวิธีการหาปริมาณ HCA โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ให้สีระหว่าง HCA กับ meta vanadate ซึ่งในรายงานระบุว่าปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นเอกลักษณ์และจำเพาะ ซึ่งก่อนหน้านี้การหาปริมาณ HCA กระทำโดยใช้ GC ตามรายงานของ Lowenstein และผู้ร่วมงาน (1981) อย่างไรก็ดีในรายงานของ Lowenstein HCA อยู่ในรูปของแข็ง (เนื้อส้มแขก) ในขั้นตอนเริ่มแรก และพยายามทำให้บริสุทธิ์ก่อนตรวจสอบด้วย GC หาก HCA อยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้ออาจจำเป็นต้องใช้ปริมาณ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อปริมาณมากในการตรวจสอบหาปริมาณ HCA ด้วย GC

ในรายงานของ Antony ยังระบุถึงความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาของ HCA กับ meta vanadate และ citric acid กับ meta vanadate สำหรับ HCA เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ให้สีส้มแดง ส่วน citric acid ยังคงให้สีเหลืองตามเดิม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โครงการนี้ต้องการแยกจุลินทรีย์ (โดยเฉพาะแบคทีเรีย) ที่มีขบวนการชีวเคมีการผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกเพื่อนำมาสร้างมิวแตนต์ (mutant) ที่ผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกสูงในอาหารน้ำเลี้ยง เพื่อนำไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการสำรวจหาแบคทีเรีย ที่เจริญบนจานอาหารขั้นต่ำ (minimal medium) ที่มี HCA เป็นแหล่งคาร์บอน นำแบคทีเรียดังกล่าวมาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยสะสม HCA ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่สูง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

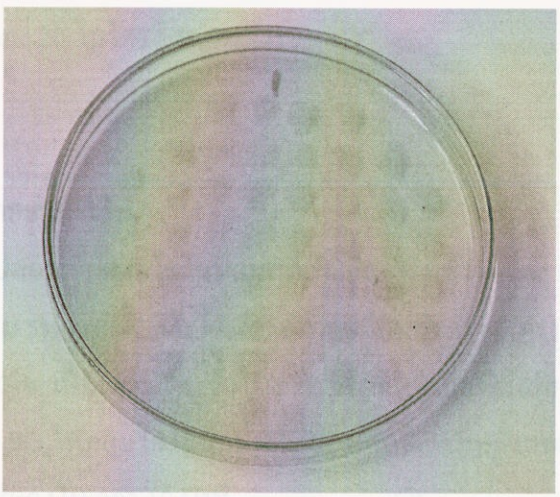
1. เป็นการสำรวจเบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม
2. พัฒนาวิธีการหาปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิตริก เพื่อตรวจสอบหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกในอาหารน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
3. พัฒนาวิธีการดัดแปลง (mutate) แบคทีเรียให้ปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริก ในอาหารน้ำเลี้ยงในปริมาณสูง

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดไฮดรอกซีซิตริก

ขั้นตอนแรกนำสารละลายตัวอย่างดินความเข้มข้น 1 กรัมหรือตัวอย่างที่เป็นของเหลวข้นของปลาร้าหรือ ปลาเจ่าหรือ ปลาส้ม 1 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มล. โดยนำ200 ไมโครลิตรมา smear บนจานอาหาร minimal salts (ดูภาคผนวก ก.) ที่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มจานอาหารที่ 30°ซ. เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยวๆแล้ว smear บนจานอาหารขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละช่อง(ดูรูปที่2)ที่รองใต้จานอาหารอาศัยผ้ากำมะหยี่ปลอดเชื้อและบล็อกโลหะถ่ายแบบ (อาศัยเทคนิค replica plating (ดูจากภาคผนวก ค.) จานละ 50 ไอโซเลท บนจานอาหารขั้นต่ำ (minimal medium) ที่มีและไม่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูผลการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่เจริญเฉพาะบนจานอาหารขั้นต่ำที่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถใช้กรดไฮดรอกซีซิตริกได้ หรือกล่าวได้ว่าเส้นทางชีวเคมีในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีกรดไฮดรอกซีซิตริกในกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย



รูปที่ 3 แสดงช่อง50ช่องโคโลนีตามตารางแม่แบบที่วางใต้จานอาหาร

ตัวอย่างของดินในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยเก็บตัวอย่างมา 5 ตัวอย่าง ปลาร้า ปลาจ่อม และปลาส้มที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากในตลาดสดข้างห้างสรรพสินค้านอรีสท์โคราช เก็บตัวอย่าง 3 ชนิด ๆ ละ 5 ตัวอย่าง

การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกโดยSpectrophotometer

การตรวจหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยการดูดกลืนแสง (absorbance) จำเป็นต้องเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงเป็นปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกจำเป็นต้องสร้างกราฟเปรียบเทียบ (calibration graph) ระหว่างความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีซิตริกกับค่าการดูดกลืนแสง ใช้เกลือ ethylene diamine ของกรดไฮดรอกซีซิตริก (98% ED-HCA, Fluka chemical company USA) ชั่งเกลือ ED-HCA ประมาณ 1.09 กรัม ละลายในอาหารเหลวขั้นต่ำ 14 มิลลิลิตร เติม 1 N H_2SO_4 1 มิลลิลิตร centrifuge ที่ 10,000 rpm สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน การทดลองใช้สารละลายมาตราฐาน 0.8 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิลิตร และเติมอาหารเหลวขั้นต่ำให้ได้ปริมาตร 9มิลลิลิตร เติม 1 N H_2SO_4 1 มิลลิลิตรแต่ละหลอด เติมสารละลาย 5% sodium meta vanadate (Fluka chemical company USA) 20 ไมโครลิตรแต่ละหลอด ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรโดยใช้ Spectronic 21 เปรียบเทียบกับ blank ที่ไม่มีสารละลายมาตรฐาน มีอาหารเหลวขั้นต่ำปริมาตร 9 มิลลิลิตร เติม1 N H_2SO_4 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 5% sodium meta vanadate 20 ไมโครลิตร

การผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกจากแบคทีเรีย

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยว ๆ แล้ว smear บนจานอาหารนิวเตรียน (ดูภาคผนวก ก.) ที่เติม 5% sodium meta vanadate ตามแม่แบบตาราง (ดูรูป) ที่รองใต้จานอาหาร บ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจผลหาแบคทีเรียที่ผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกโดยเทสารละลาย 1 N H_2SO_4ให้คลุมโคโลนีแบคทีเรีย แบคทีเรียที่หลั่งกรดไฮดรอกซีซิตริกออกมาในเนื้ออาหารแข็งจะปรากฏสีแดงในเวลา 10 นาที

การเตรียมน้ำเลี้ยงเพื่อวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก

ก. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท 1 loop จาก slant culture ลงในอาหารเหลวขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เลี้ยงเป็น overnight culture ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

ข. ถ่ายเชื้อจาก overnight cultureทั้งหมด ด้วย pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเหลวขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 110 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเชื้อมา 10 มิลลิลิตร นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตรโดยใช้ Spectronic 21 ติดตามการเจริญของแบคทีเรีย โดยนับเวลาการเลี้ยงเริ่มที่ 0 นาที เลี้ยงที่ 30°ซ. เขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm จากนั้นติดตามการเจริญทุกๆ 6 ชั่วโมงโดยใช้ pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเชื้อมา 10 มิลลิลิตรวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620นาโนเมตร

ค. นำน้ำเลี้ยงที่เก็บได้จากข้อ ข.มาปั่นแยกเซลล์โดย centrifuge ที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ไว้ตรวจวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกนำ supernatant 9 มิลลิลิตร เติม1 N H_2SO_4 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 5% sodium meta vanadate 20 ไมโครลิตร

ง. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรโดยใช้ Spectronic 21

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างกรดไฮดรอกซีซิตริก

เลือกจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียจากดิน ที่สามารถเจริญบนจานอาหารขั้นต่ำ (ดูภาคผนวก ก.) ที่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แบคทีเรียที่เจริญบนจานดังกล่าว 10 สายพันธุ์ ตั้งชื่อสายพันธุ์เป็น SB (Soil Bacteria) 1-SB10

เลือกจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียจากปลาร้า ปลาจ่อม และ ปลาส้มที่สามารถเจริญบนจานอาหารขั้นต่ำ (ดูภาคผนวก ก.) ที่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งได้แบคทีเรียที่เจริญบนจานดังกล่าว 15 สายพันธุ์(ปลาร้า 0 ไอโซเลท ปลาจ่อม 8 ไอโซเลท และ ปลาส้ม 7 ไอโซเลท ตามลำดับ) ตั้งชื่อสายพันธุ์เป็น FFB(Fish Fermented Bacteria)1-FFB15

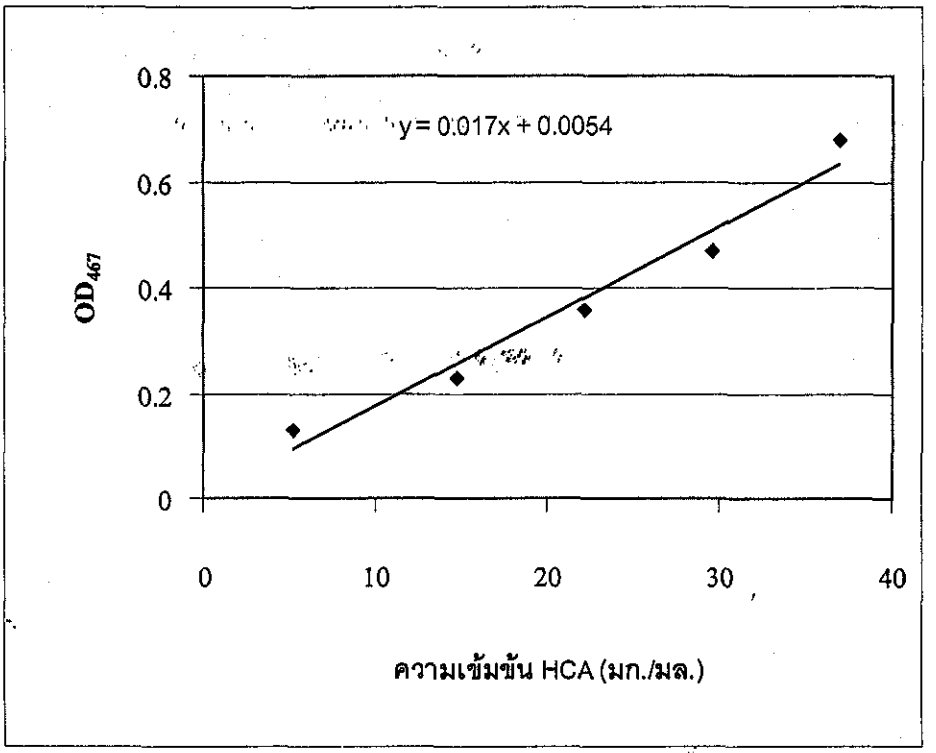
ผลการสร้างกราฟมาตราฐานเพื่อหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกโดยSpectrophotometer

การทดลองการหาปริมาณ(ความเข็มข้น)กรดไฮดรอกซีซิตริกเปรียบเทียบกับการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทำกราฟมาตรฐานการหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก

ปริมาณ (ความเข้มข้น) HCA mg/ml	การดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 467 nm
5.2	0.13
14.7	0.23
22.1	0.36
29.5	0.47
36.9	0.68

ข้อมูลจากตารางที่1 เขียนกราฟมาตรฐานได้ดังรูปกราฟที่ 1



รูปกราฟที่1 แสดงกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก

ผลการผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกจากแบคทีเรีย

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรีย SB1-SB10 แล้ว smear บนจานอาหารนิวเตรียน (ดูภาคผนวก ก.)ที่เติม 5% sodium meta vanadate บ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย SB1-SB10

หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4 ให้คลุมโคโลนีแบคทีเรีย SB1-SB10 ปล่อยทิ้งไว้เวลามากกว่า 10 นาทีปรากฏดังรูปที่ 5 ต่อไปนี้

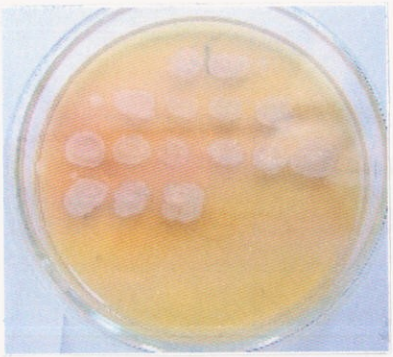
รูปที่ 5 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย SB1-SB10 หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4

ไม่ปรากฏมีวงสีแดงรอบโคโลนีใด แสดงว่าแบคทีเรีย SB1-SB10 ไม่หลั่งกรดไฮดรอกซีซิตริกออกมาในเนื้ออาหารแข็ง

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรีย FFB1-FFB15 แล้ว smear บนจานอาหารนิวเตรียน (ดูภาคผนวก ก.) ที่เติม 5% sodium meta vanadate บ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 6

รูปที่ 6 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1-FFB15

หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4ให้คลุมโคโลนีแบคทีเรีย FFB1-FFB15 ปล่อยทิ้งไว้มากกว่า 10 นาทีปรากฏดังรูปที่ 7 ต่อไปนี้



รูปที่ 7 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1-FFB15 หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4

ปรากฏมีวงสีแดงรอบโคโลนีบางโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรีย FFB1-FFB10 บางโคโลนีหลั่งกรดไฮดรอกซีซิตริกออกมาในเนื้ออาหารแข็ง แต่แยกไม่ออกว่าเป็นโคโลนีใดของแบคทีเรีย

จึงทดลองโดยในจานอาหารมีเพียง 2 โคโลนี โดยใช้โคโลนี FFB1 เป็นโคโลนีที่ไม่หลั่งกรดไฮดรอกซีซิตริกออกมาในเนื้ออาหารแข็งเปรียบเทียบกับโคโลนี FFB2-FFB15 จนครบ พบว่าโคโลนี FFB9 และโคโลนี FFB12หลั่งกรดไฮดรอกซีซิตริกออกมาในเนื้ออาหารแข็งดังรูปที่ 8 และ 10 ต่อไปนี้

รูปที่ 8 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1 (บน) FFB9 (ล่าง)

หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4 ให้คลุมโคโลนี FFB1 และโคโลนี FFB9 ปล่อยทิ้งไว้มากกว่า 10 นาทีปรากฏดังรูปที่ 9 ต่อไปนี้

รูปที่ 9 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1 (บน) FFB9 (ล่าง) หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4

รูปที่ 10 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1(บน) FFB12(ล่าง)

หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4ให้คลุมโคโลนี FFB1 และโคโลนี FFB12 ปล่อยทิ้งไว้มากกว่า 10 นาที ปรากฏดังรูปที่ 11 ต่อไปนี้

รูปที่ 11 แสดงจานอาหารที่มีแบคทีเรีย FFB1 (บน) FFB12 (ล่าง) หลังจากเทสารละลาย 1 N H_2SO_4

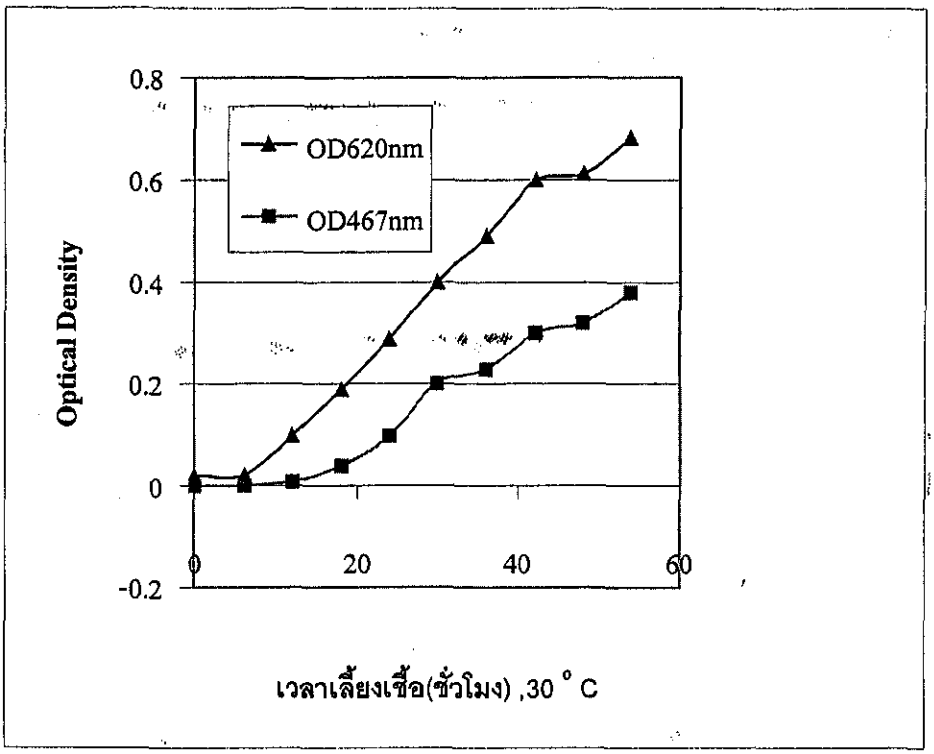
ผลการวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย

หลังจากเตรียมน้ำเลี้ยงเพื่อวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกโดยวิธีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ทั้งของไอโซเลท SB1-SB10 และ FFB1-FFB15 พบว่าการเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท FFB9 และไอโซเลท FFB12 เท่านั้นที่สามารถวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกได้ สำหรับการเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท FFB9 ได้ผลการทดลองดังปรากฏในตารางที่ 2 ต่อไปนี้

ตารางที่ 2 แสดงความขุ่นของเซลล์ และการดูดกลืนของแสงที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตร ของ น้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB9

เวลา (ชั่วโมง)	OD_{620}	OD_{467}
0	0.02	0.00
6	0.02	0.00
12	0.10	0.01
18	0.19	0.04
24	0.29	0.10
30	0.40	0.20
36	0.49	0.23
42	0.60	0.30
48	0.61	0.32
54	0.68	0.38

ข้อมูลจากตารางที่ 2 นำมาเขียนรูปกราฟที่ 2ได้ดังต่อไปนี้



รูปกราฟที่ 2 แสดงความขุ่นของเซลล์ หรือการเจริญของเซลล์ แบคทีเรีย (OD_{620}) และปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก (OD_{467}) ของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB9

จากสมการ $y = 0.017x + 0.0054$

ถ้า $y = 0.38$

$x = 22.035$ มก./ มล.

10 มล. มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก = 220.35 มก.

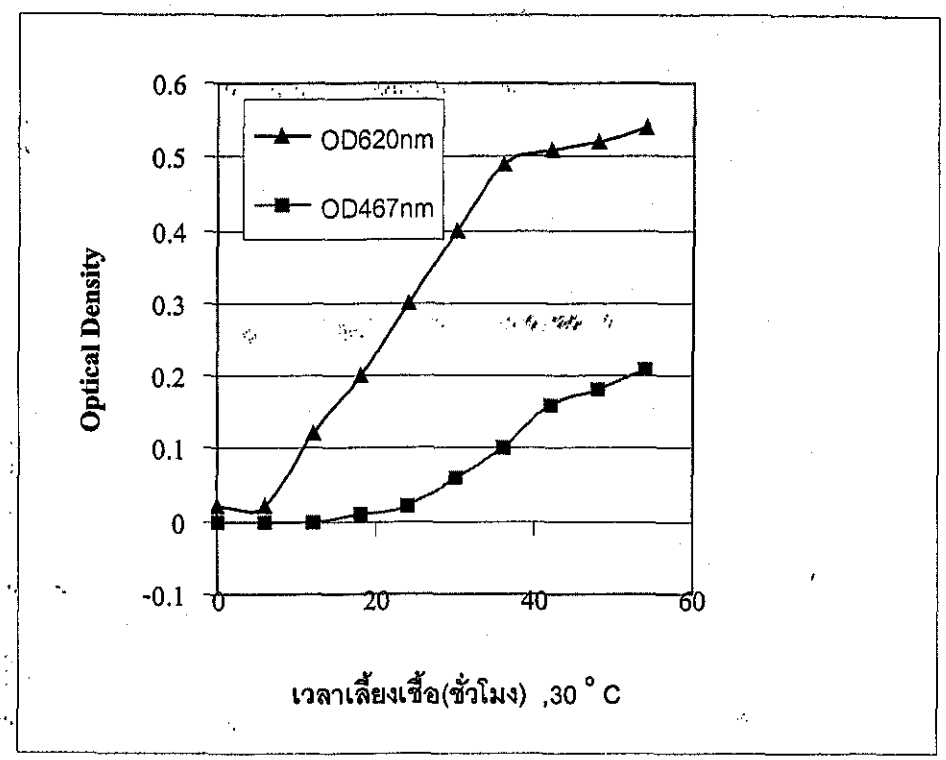
ดังนั้น น้ำเลี้ยง 9 มล. มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก = 220.35 มก.

หรือน้ำเลี้ยง 1 มล. มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก = 24.48 มก.

ตารางที่ 3 แสดงความขุ่นของเซลล์ และการดูดกลืนของแสงที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB12

เวลา (ชั่วโมง)	OD_{620}	OD_{467}
0	0.02	0.00
6	0.02	0.00
12	0.12	0.00
18	0.20	0.01
24	0.30	0.02
30	0.40	0.06
36	0.49	0.10
42	0.51	0.16
48	0.52	0.18
54	0.51	0.21

ข้อมูลจากตารางที่ 3 นำมาเขียนรูปกราฟที่ 3 ได้ดังต่อไปนี้



รูป กราฟที่ 3 แสดงความขุ่นของเซลล์ หรือการเจริญของเซลล์ แบคทีเรีย (OD_{620}) และปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก (OD_{467}) ของน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์ FFB12

จากสมการ $y = 0.017x + 0.0054$

ถ้า $y = 0.21$

$x = 12.035$ มก./ มล.

10 มล. มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก = 120.35 มก.

ดังนั้น น้ำเลี้ยง 9 มล. มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก = 120.35 มก.

หรือน้ำเลี้ยง 1 มล. มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก = 13.37 มก.

อภิปราย

แม้ว่าแบคทีเรียที่เจริญบนจานเจริญบนจานอาหารขั้นต่ำที่มีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ถึง 25 สายพันธุ์ แต่จะสรุปไม่ได้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวสร้างกรดไฮดรอกซีซิตริกปล่อยออกมานอกเซลล์หรือไม่ เพียงแต่กล่าวได้ว่าเส้นทางชีวเคมีในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีกรดไฮดรอกซีซิตริกในเส้นทางชีวเคมี (biochemical pathways) ภายในเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวเท่านั้น การวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิตริก (5) ด้วย GC มีปัญหาโดยภาพรวมว่าวิธีการสกัดกรดไฮดรอกซีซิตริกจากน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย หรือจากเซลล์ที่แตกของแบคทีเรียหากมีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกน้อย จากเอกสารที่วิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิตริกด้วยGCมีเพียงการสกัดกรดไฮดรอกซีซิตริกจากส้มแขกซึ่งมีกรดไฮดรอกซีซิตริกในปริมาณสูงอยู่แล้ว ดังนั้นในตอนเริ่มทำการวิจัยโดยมุ่งหาวิธีการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิตริกด้วย GC จึงได้ผลการวิจัยที่ไม่แน่นอนอันเนื่องมาจากปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริก และปัญหาการสกัดกรดไฮดรอกซีซิตริกจากน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

ในที่สุดปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ จากรายงานของ Anthony และผู้ร่วมงาน (1999) ได้เสนอการวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกด้วย Spectrophotometer ข้อดีของรายงานดังกล่าวยังอ้างว่า sodium meta vanadate เมื่อทำปฏิกิริยากับ กรดไฮดรอกซีซิตริกจะทำให้เกิดสีแดง หากทำปฏิกิริยากับกรดซิตริกยังคงเป็นสีเหลืองตามเดิม ทั้งนี้รายงานดังกล่าวสามาถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือก (screen) หาแบคทีเรียที่ปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริกออกนอกเซลล์ได้

อย่างไรก็ดีการวัดหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกด้วย Spectrophotometer เป็นไปอย่างหยาบ เนื่องจากสารละลายที่นำมาวัดเป็นสารละลายที่เกิดจากการผสมผสานของสารหลายชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจว่าน่าจะมีการตรวจสอบหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกด้วยวิธีอื่นเช่น HPLC (4)ในโอกาสต่อไป

สำหรับการดัดแปลง (mutate) แบคทีเรียทำให้แบคทีเรียปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริก ในอาหารน้ำเลี้ยงในปริมาณสูงโดยใช้ chemical mutagen ในกรณีนี้ใช้N-methyl-N' nitro-N-nitrosoguanidine (NG) (ดูภาคผนวก ง.) หลังจากใช้ไอโซเลทFFB9 มาทำการผ่าเหล่าด้วย NG และเลือกโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยวๆ 10,000โคโลนี แล้ว smear บนจานอาหารจานอาหารขั้นต่ำมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโคโลนีแบคทีเรียที่ไม่เจริญบนจานอาหารขั้นต่ำมีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน การผ่าเหล่ากับแบคทีเรียโดยการทำเช่นนี้เพื่อตัดขั้นตอนเปลี่ยนกรดไฮดรอกซีซิตริกไปเป็น intermediate อื่น ทำให้สะสมเฉพาะกรดไฮดรอกซีซิตริกมากขึ้น จากการทดลองไม่พบโคโลนีแบคทีเรียที่**ไม่เจริญ**บนจานอาหารขั้นต่ำมีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน

สำหรับการแก้ปัญหาการสร้างแบคทีเรียที่สามารถปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริก ในอาหารน้ำเลี้ยงในปริมาณสูงกว่าเดิม อาจกระทำได้โดยวิธีการอื่น การโคลนยีน (gene cloning) น่าจะเป็นแนว

ทางที่เหมาะสมสำหรับกรณีนี้ หากได้ยีนดังกล่าวอยู่บนพาหะนำยีนเช่น พลาสมิด เมื่อพลาสมิดเพิ่มจำนวนทำให้ได้ยีนดังกล่าวมากกว่าเดิม ทำให้แบคทีเรียปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริก ในอาหารน้ำเลี้ยงในปริมาณสูงขึ้นได้

อย่างไรก็ดีกรณีไอโซเลท FFB9 สามารถปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริกออกมาในอาหารน้ำเลี้ยงในปริมาณ 24.48 มก./มล. โดยเลี้ยงในอาหารเหลวขั้นต่ำ ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 54 ชั่วโมง หากเลี้ยงในอาหาร complex medium อาจปล่อยกรดไฮดรอกซีซิตริก ในอาหารน้ำเลี้ยงมากกว่าเดิมในเวลาที่สั้นลง นั่นคือการปรับอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ หรือ เติมโลหะบางตัว สายพันธุ์ดังกล่าวอาจเหมาะสมที่จะนำไปใช้ผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกระดับอุตสาหกรรมได้

กรณีที่เลือกอุณหภูมิที่ 30°ซ เนื่องมาจากแบคทีเรียดังกล่าวแยกได้มาจากปลาส้มซึ่งประชากรแบคทีเรียส่วนใหญ่มักชอบเจริญในอุณหภูมิห้อง

เป็นที่น่าสนใจว่าสายพันธุ์ FFB9 สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติค (probiotic) ได้หรือไม่ เพราะว่าถ้าสายพันธุ์ดังกล่าวหากสามารถอยู่ในลำไส้คนจะเป็นการแก้ปัญหาน้ำหนักตัวของบุคคลนั้นอย่างถาวร

ดังนั้นธรรมชาติของแบคทีเรียเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจ เพื่อเข้าใจแบคทีเรียเหล่านี้ให้ดีขึ้น สำหรับ SB1-SB10 อยู่ในสกุล *Micrococcus* โดยย้อมสีกรัม (ดูภาคผนวก ข.) ผลเป็นกรัมบวก มี Catalase activity แต่ไม่เจริญบนจานอาหาร Mannitol salt agar ซึ่งมี NaCl ถึง 7.5% (ดูภาคผนวก ก.) คุณสมบัติดังกล่าวแสดงว่าแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Micrococcus* ส่วน FFB1-FFB15 ยังไม่ได้ทำการศึกษา

บทที่ 4
บทสรุป

รายงานนี้อาจเป็นรายงานแรกที่เสนอว่าแบคทีเรียสามารถผลิตกรดไฮดรอกซีซิตริกได้ การทดลองนี้พบแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่แยกจากปลาส้มจากตลาดสดในเขตอำเภอเมืองนครราชสีมา ซึ่งตั้งชื่อ FFB9 และ FFB12 เลี้ยงในอาหารเหลวขั้นต่ำ ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 54 ชั่วโมง สามารถสร้างกรดไฮดรอกซีซิตริกซึ่งตรวจหาความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีซิตริกในน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการวัดสเปคโตรโฟโตที่ช่วงคลื่น 467 นาโนเมตรได้สูงถึง 24.48 และ 13.37 มก./มล. ตามลำดับ

บรรณานุกรม

1. ศัลยา คงสมบูรณ์เวช. (21 มกราคม 2541). แนะวิธีป้องกันเป็น พะโล้. *มติชน*: 12.
2. *ไทยแลนด์:เมดิคอลไทม์*. (2544). เปิดโลกสมุนไพร. 2(35): 28.
3. Antony, B., *et al.* (1999). Spectrophotometric determination of hydroxy citric acid. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 61(5): 316-317.
4. Jayaprakasha, G. K. and K. K. Sakariah (1998). Determination of organic acids in *Garcinia cambogia* (Desr.) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 806 (2): 337-339.
5. Lowenstein, JM, *et. al.* (1981) Hydroxycitrate *Methods Enzymol.* 72:487-497.
6. Rao, DR., *et. al.* (1966) Metabolism of hydroxycitrie acid in Micrococcus. *Biochen Z.* 344(4): 396 - 400.
7. Shara M, ., *et al.* (2004). Physico-chemical properties of a novel (-)-hydroxycitric acid extract and its effect on body weight, selected organ weights, hepatic lipid peroxidation and DNA fragmentation, hematology and clinical chemistry, and histopathological changes over a period of 90 days.*Mol Cell Biochem.* 260(1-2):171-86.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

สูตรจานอาหารนิวเตรียน (Nutrient Agar) (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.0±0.2		

สูตรอาหารขั้นต่ำ (Minimal medium) (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.7	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
แหล่งคาร์บอน		
กรดไฮดรอกซีซิตริก	10.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
กรณีทำจานี้อาหารเติม		
Agar	20.0	กรัม
ปรับ pH เป็น 6.0-8.0		

จานอาหาร Mannitol salt agar (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Yeast extract	2.5	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Lactose	2.0	กรัม

Mannitol	10.0	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
NaCl	75.0	กรัม
Phenol red	0.018	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000 .0	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.2

<u>บัฟเฟอร์</u>

Citrate buffer pH 5.5 (0.1 M)

0.1 M Citric acid	4.7	ปริมาตร
0.1 M Na_3 citrate	15.4	ปริมาตร

คุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ

กิจกรรมเอนไซม์คาตาเลส (catalase activity)

1. หยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) บนโคโลนีของสายพันธุ์แบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารนิวเตรียน
2. ตรวจดูว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น

ภาคผนวก ข

วิธีการย้อมสีแบบกรัม

มีขั้นตอนดังนี้

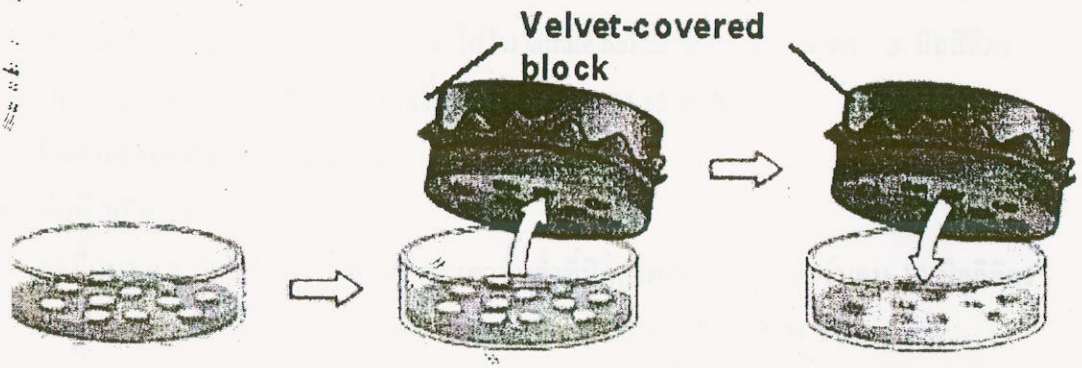
1. ใช้ห่วงลวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการลนกับเปลวไฟจากตะเกียงบุนเสน นำไปแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ที่สะอาด
2. ละเลง (smear) เชื้อที่อยู่บนสไลด์ให้กระจายออกเป็นบริเวณรอบ ๆ
3. ปล่อยสไลด์ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง (air dry)
4. ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์โดยความร้อน (heat-fixed) โดยนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงบุนเสน ถ้าลนไฟนานเกินไปจะทำให้เซลล์ไหม้ ลองเอาสไลด์แตะบนหลังมือ ถ้าสไลด์อุ่น ๆ แสดงว่าใช้ได้
5. ปล่อยให้สไลด์เย็นลง แล้วจึงนำสไลด์วางบนแท่นย้อมหยดน้ำยา Crystal violet ปล่อยทิ้งไว้นาน 1 นาที
6. เทสีออก ล้างด้วยน้ำก๊อก แล้วใส่น้ำยาไอโอดีนไว้นาน 1 นาที เพื่อช่วยให้ติดสีดีขึ้น (mordant)
7. ล้างด้วยน้ำที่ไหลอ่อน ๆ สลัดน้ำออกจากสไลด์จนหมด
8. ใช้น้ำยาล้างสี (decolorizer) หยดให้ไหลผ่านสไลด์จนน้ำที่หยดผ่านไม่มีสีติดออกมาด้วย ขั้นนี้ใช้เวลา 3-10 วินาที ขึ้นอยู่กับความหนาบางของเชื้อที่ทาบนสไลด์ ระวังอย่าล้างสีออกมากเกินควร เพราะจะทำให้ได้ผลที่ผิดพลาด
9. ล้างด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว สลัดน้ำออกจากสไลด์จนหมด
10. ย้อมควบด้วยสีย้อมควบคู่ (Counterstain) คือ Safranin 0 นาน 1 นาที
11. ล้างออกด้วยน้ำ
12. ซับน้ำออก และปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท แล้วดูด้วยหัวน้ำมันของกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียที่เป็นกรัมบวกจะติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินของ crystal violet ส่วนพวกที่เป็นกรัมลบจะติดสีแดงหรือสีชมพูของ Safranin 0

ภาคผนวก ค

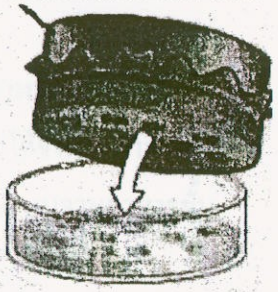
เทคนิค Replica plating

มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยวๆแล้ว smear บนจานอาหาร complete medium (เช่น marine agar) ในแต่ละช่องของแม่แบบตารางที่รองใต้จานอาหาร
2. บ่มจานอาหาร ให้ โคโลนีแบคทีเรียเจริญ
3. นำผ้ากำมะหยี่ปลอดเชื้อวางบนบล็อกโลหะรัดผ้ากำมะหยี่กับบล็อกโลหะ กดให้ผิวผ้ากำมะหยี่สัมผัสกับโคโลนีแบคทีเรียบนจานอาหาร complete medium
4. แบบและตำแหน่งของโคโลนีแบคทีเรียนี้สามารถนำไปถ่ายแบบให้กับจานอาหารชนิดต่างๆได้
5. นำจานอาหารชนิดต่าง ๆ ไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิเหมาะสม
6. ตรวจผลการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียจานอาหารชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกัน



จานอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



จานอาหารที่มีกรดไฮดรอกซีซีจริกเป็นแหล่งคาร์บอน

ภาคผนวก ง

การทำการผ่าเหล่า(Mutagenesis)

ก. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท 1 loop จาก slant culture ลงในอาหารเหลวขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เลี้ยงเป็น overnight culture ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

ข. ถ่ายเชื้อจาก overnight culture ด้วย pipette ที่ปลอดเชื้อแล้วลงในอาหารเหลวขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30°ซ. เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm

ค. นำน้ำเลี้ยงที่เก็บได้มาปั่นแยกเซลล์โดย centrifuge ที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที

ง. ล้างเซลล์ด้วย citrate buffer pH 5.5ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

จ. ละลายเซลล์ใน citrate buffer pH 5.5 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตรในหลอด เติมสารละลาย N-methyl-N' nitr o-N-nitrosoguanidine (NG) 0.5 มิลลิลิตร สารละลายดังกล่าวเตรียมในทันทีที่จะใช้โดยชั่ง NG 0.005 กรัม ใส่ใน citrate buffer pH 5.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บด NG ด้วยปลายแท่งแก้วปลอดเชื้ออุ่นที่ 37°ซ. เวลา 15 นาที

ฉ. ปั่นก้นหลอดด้วย Vortex mixer

ช. บ่มที่ 30°ซ. เวลา 30 นาที

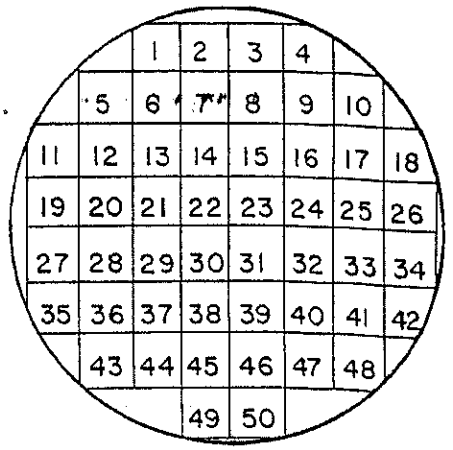
ซ. ดูดขึ้นมา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 10 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ทำ overnight culture ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ฌ. จาก overnight culture 0.2มิลลิลิตรเกลี่ยบนจานอาหารขั้นต่ำมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่30°ซ. เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ญ. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยวๆแล้ว smear บนจานอาหารจานอาหารขั้นต่ำมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในแต่ละช่องของแม่แบบตารางที่รองใต้จานอาหารอาศัย replica plating technique (ดูภาคผนวก) เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ไม่เจริญบนจานอาหารขั้นต่ำมีกรดไฮดรอกซีซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน

ฎ. จากโคโลนีที่ได้จากข้อญ. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยวๆแล้ว smear บนจานอาหารขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละช่องของแม่แบบตาราง 50 ช่อง

ที่รองใต้จานอาหารอาศัยผ้ากำมะหยี่ปลอดเชื้อและบลือกโลหะถ่ายแบบ(อาศัยเทคนิค replica plating ดูจากภาคผนวก)จานละ 50 ไอโซเลท บนจานอาหารขั้นต่ำ (minimal medium) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมี 1% sodium meta vanadate โคโลนีที่ปรากฏสีแดงชัดกว่าโคโลนีอื่นแสดงว่าหลั่งปริมาณกรดไฮดรอกซีซิตริกสูงที่สุด



ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล นายสิทธิโชค แสงโสดา

เกิด 23 ธันวาคม 2489

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และประกาศนียบัตร)	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2512	ตรี	วท.บ.(ชีววิทยา) (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	ชีววิทยา	ชีววิทยา	ม. เชียงใหม่	ไทย
2525	โท	D.E.A.(Microbiology) Diplome d'etude Approfondie	Biology	Microbiology	Paris XI	France
2527	เอก	Doctor de 3emecycle (Microbiology)	Biology	Microbiology	Paris XI	France

สาขาวิชาที่มีความชำนาญ Microbiology, Molecular biology

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Cherest, H., Sangsoda, S., and Surdin-Kerjan, Y. (1984) Regulation de l'expression des gene MET3 et MET25 chez Saccharomyces cerevisiae. Collogue "Recherches Fondamentales en amont des Biotechnologies" Centre National de la Recherche Scientifique au Ministere de la Technologie, 19 November 1984.
2. Sangsoda, S., Cherest, H., and Surdin-Kerjan, Y. (1985) The expression of the MET25 gene of Saccharomyces cerevisiae is regulated transciptionally. *Mol. Gen. Genet.*, 200 : 407-414.

3. Sangsoda, S. (1987). A simple microscale technique for isolation of plasmid DNA from bacteria. 5th Seminar of Genetics at Prince Songkla University, 13-15 May 1987.
4. Sangsoda, S., S. Ploykasem and A. Hanpongkitikul. (1987) Amylase/glucoamylase complex enzymes XIV Conf. Sci. Soc., Thailand.
5. Tantayapinan. O., S. Sangsoda and S. Phutrakul. (1987) Cloning of endocellulase gene from edible mushroom on pFL2 in *E. coli* C600 ecIls. XIV conf. Sci. Soc., Thailand.
6. Sangsoda, S., S. Phutrakul and P. Kanasawad. (1992) Extracellular hydrolases by extremely thermophilic bacteria form Teppanom Hot Spring, The Second Princess Chulabhorn Science Congress Environment. Science and Technology: The Challenges of the 21th Century November 2-6 1992, Bangkok, Thailand.
7. Sangsoda. S., S. Maneerat., P. Kanasawad and S. Phutrakul. (1993) Specific plate for isolation of bacteria producing lipases. The 5th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology, 25-27 November 1993.
8. Phutrakul, S., P.Kanasawad, and S. Sangsoda. (1993) Hydrolases from hot spring thermophiles and their catalytic activities in non-aqueous media. 10th Federation of Asian and Oceanian Biochemists Symposium. 8-10 December 1993.