



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของ
แบคทีเรียอะซิติกทนร้อนเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

โดย นางดวงทิพย์ มุลมั่งมี

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ : กรกฎาคม พ.ศ. 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียอะซิติก
ทนร้อนเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- นางดวงทิพย์ มุลมั่งมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- นายสมบูรณ์ ธนาสุภาวัฒน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนทุนพัฒนาอาจารย์รุ่นใหม่แก่ผู้วิจัยในระหว่างปี 2547-2548

ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการ Core University Program ระหว่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และมหาวิทยาลัยยามะกุจิ ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้การสนับสนุนของ Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) และสภาวิจัยแห่งชาติ (NRCT) ที่ให้การสนับสนุนทุนเดินทางไปทำวิจัยด้านเอนไซม์ในแบคทีเรียอะซิติกที่มหาวิทยาลัยยามะกุจิ

ขอขอบพระคุณ Emeritus Prof. Dr. Osao Adachi และ Prof. Dr. Kazunobu Matsushita แห่ง Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลองตลอดจนให้คำปรึกษาเรื่องการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ และผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Hirohide Toyama แห่ง Department of Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Japan ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ ซึ่งได้ให้คำแนะนำปรึกษาที่มีประโยชน์ต่อโครงการวิจัยนี้เป็นอย่างมาก

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ความสะดวกด้านสถานที่และสาธารณูปโภค สำหรับทำวิจัยในโครงการนี้จนเสร็จสิ้น

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4780003

ชื่อโครงการ : การพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียอะซิติก
ทนร้อนเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน :

1. นางดวงทิพย์ มุลมั่งมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2. นายสมบุญ ธนาศุภวัฒน์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : duangtip.moo@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (พ.ศ. 2547 – พ.ศ. 2548)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนที่ผลิตน้ำตาลซอโบสได้ และศึกษาพัฒนาการตรึงเซลล์และเอนไซม์ซอโบสไฮโดรจีเนสในวัสดุตรึงเพื่อการผลิตน้ำตาลซอโบส วิธีการทดลองทำการแยกแบคทีเรียอะซิติกจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ ให้เป็นแบคทีเรียบริสุทธิ์ นำมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน ปฏิกริยาทางชีวเคมีและวิธีการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และศึกษากิจกรรมเอนไซม์ซอโบสไฮโดรจีเนส ทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี และศึกษาการตรึงเอนไซม์ การตรึงเซลล์ในวัสดุชนิดโซเดียมอัลจิเนต รวมทั้งได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูง ผลการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียอะซิติกจำนวน 75 ไอโซเลต ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 36 ไอโซเลต จากการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีการทดสอบปฏิกริยาทางชีวเคมีและการหาลำดับเบสของ 16S rDNA สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม และจำแนกได้เป็น *Acetobacter pasteurianus* จำนวน 5 ไอโซเลต, *Gluconobacter frateurii* จำนวน 22 ไอโซเลต และ *Gluconacetobacter xylinus* จำนวน 9 ไอโซเลต แบคทีเรียที่สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้มีเพียงกลุ่มเดียวคือ *G. frateurii* จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กับกิจกรรมเอนไซม์ซอโบสไฮโดรจีเนสจาก *G. frateurii* ทั้งหมด 22 ไอโซเลต พบ *G. frateurii* KMUTT26 สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสและให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์พบว่าอยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรน และมี PQQ เป็น prosthetic group เอนไซม์มีความเสถียรต่อทรีสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 สามารถแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอโบสไฮโดรจีเนสด้วย DEAE-Toyopearl และ CM-Toyopearl คอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยละลายเอนไซม์ด้วยดีเทอเจนท์ชนิดไม่มีประจุ คือ Mydol 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 5.0 สามารถออกซิไดซ์น้ำตาลแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด เอนไซม์บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงสุดที่ 32 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์ที่ยังอยู่ในเยื่อหุ้มเมมเบรนมีความเสถียรสูงถึง 38 องศาเซลเซียส การผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์บริสุทธิ์ เยื่อหุ้มเมมเบรนและเซลล์แบคทีเรียในโซเดียมอัลจิเนต พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ผลิตน้ำตาลซอโบสได้ดีที่สุดที่ 25 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่การตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนและเซลล์ให้ผลการผลิตสูงกว่าในอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนและตรึงเซลล์คือใช้ซอโบส 15 เปอร์เซ็นต์ให้อากาศ 100 รอบต่อนาที่ ซึ่งสามารถนำเม็ดอัลจิเนตกลับมาใช้เพื่อการผลิตซอโบสได้ใหม่จำนวน 2-4 ครั้ง

คำหลัก : แบคทีเรียอะซิติกทนร้อน, น้ำตาลซอโบส, เอนไซม์ซอโบสไฮโดรจีเนส, การตรึง

Abstract

Project Code : MRG4780003
Project Title : Development of production process of oxidation products from thermotolerant acetic acid bacteria for industrial applications

Investigator :

1. Mrs. Duangtip Moonmangmee
Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi
2. Mr. Somboon Tanasupawat
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

E-mail Address : duangtip.moo@kmutt.ac.th

Project Period : 2 years (2004-2005)

This research aims were to study diversity of thermotolerant acetic acid bacteria produce L-sorbose and develop cell and enzyme immobilization for L-sorbose production. The experiments were performed by isolation of acetic acid bacteria from natural sources to pure cultures and followed by identification using morphology, biochemical tests and 16S rDNA sequencing. The bacterial cultures were further performed the experiments on L-sorbose production at 37°C and measurement of sorbitol dehydrogenase activity. The enzyme sorbitol dehydrogenase was purified by column chromatographies. Immobilized cell and enzyme with sodium alginate as well as the factors affecting to L-sorbose production at high temperature by immobilized cell or enzyme were also conducted. As the results, seventy-five isolates of acetic acid bacteria were isolated. Among these, thirty-six isolates grew at 37°C. Identification of acetic acid bacteria by biochemical tests and 16S rDNA gene sequencing divided into 3 groups which identified to be 3 isolates of *Acetobacter pasteurianus*, 22 isolates of *Gluconobacter frateurii* and 9 isolates of *Gluconacetobacter xylinus*. *G. frateurii* was the only group that produced L-sorbose. Determination of L-sorbose production at 37°C and sorbitol dehydrogenase activity from 22 isolates of *G. frateurii* found that *G. frateurii* KMUTT26 produced the highest L-sorbose as well as enzyme activity. Sorbitol dehydrogenase activity was located in cytoplasmic membrane and had PQQ as the prosthetic group. Enzyme was stabilized in Tris-HCl buffer pH 7.5. The enzyme was solubilized with nonionic detergent, Mydol 10 and the enzyme was successively purified with DEAE-Toyopearl and CM-Toyopearl column chromatography. The purified enzyme had molecular mass of 80 kDa and optimum pH at 5.0. The purified enzyme oxidized various sugar alcohols and stabilized at 32°C, while enzyme activity on cytoplasmic membrane was stabilized at 38°C. L-Sorbose production with immobilized pure enzyme, cytoplasmic membrane and cell in sodium alginate showed that immobilized pure enzyme produced L-sorbose at 25°C higher than that of 30 and 37°C, where as immobilized cytoplasmic membrane and cell produced higher amount at 30 and 37°C, respectively. Using 15% sorbitol with aeration at 100 rpm was found to be the optimum condition for L-sorbose production with immobilized cytoplasmic membrane and cell in which the alginate beads could be recycle for 2-4 times.

Keywords : acetic acid bacteria, sorbose, sorbitol dehydrogenase, immobilization

บทนำ

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นบริเวณแถบเส้นศูนย์สูตร มีความได้เปรียบทางด้านความหลากหลายทางทรัพยากรชีวภาพในกลุ่มของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในปัจจุบันและต่อเนื่องถึงในอนาคต ความหลากหลายทางชีวภาพนับวันจะหมดไปเนื่องมาจากการบุกรุกทำลายป่าไม้ และสิ่งแวดล้อม อันส่งผลให้ระบบนิเวศถูกเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลกระทบอย่างยิ่งต่อชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในระบบนิเวศ การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศต่างๆ ได้มีผู้ศึกษาวิจัยอยู่เป็นจำนวนมากเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาระดับสูงต่อไป แต่สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียอะซิติกได้พบว่ามีผู้ศึกษาอยู่จำนวนน้อย และจากเอกสารวิชาการด้านการค้นพบและจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการค้นพบแบคทีเรียอะซิติกที่มีคุณสมบัติทนร้อนและหรือเป็นแบคทีเรียอะซิติกชนิดใหม่หลายชนิดทั้งจากประเทศไทย (Moonmangmee และคณะ, 2000, 2001, 2002, Yukphan และคณะ, 2004) และจากประเทศอินโดนีเซีย (Lisdiyanti และคณะ, 2001) แบคทีเรียอะซิติกดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์และสำคัญอย่างยิ่งต่อมนุษยชาติตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน หลังจากการค้นพบว่าแบคทีเรียอะซิติกเป็นจุลินทรีย์ผู้ผลิตน้ำส้มสายชูในสมัยโบราณมากกว่า 100 ปี และยังใช้ผลิตจนถึงปัจจุบัน แบคทีเรียอะซิติกสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสที่ใช้เป็นสารตัวกลางที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตวิตามินซี ซึ่งเป็นวิตามินเพียงชนิดเดียวที่มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ต้องสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี (Moonmangmee และคณะ, 2000) และมนุษย์ต้องรับวิตามินซีเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทาน วิตามินซีเป็นวิตามินที่มีความสำคัญช่วยป้องกันโรคหลักปิดกั้นเปิดและโรคเกี่ยวกับผิวหนังบางชนิด ในการผลิตวิตามินซีของ Reichstein มีขั้นตอนที่สำคัญที่ใช้จุลินทรีย์เพียงขั้นตอนเดียวในการผลิต ได้แก่ การใช้แบคทีเรียอะซิติกทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซอพิทอลเป็นน้ำตาลซอโบส (Adachi และคณะ, 2003) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูงจะทำให้สามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตวิตามินซีได้อีกทางหนึ่ง

นอกจากนี้แบคทีเรียอะซิติกยังสามารถผลิตน้ำตาลที่สำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและขนมหวาน เช่นน้ำตาลฟรุทโตส (Barker และ Shirley, 1980; Bhosale และคณะ, 1996) ผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน และอิทธิรูโลส (Moonmangmee และคณะ, 2002) สำหรับใช้ในเครื่องสำอางสำหรับทาผิวให้เกิดสีแทนธรรมชาติโดยไม่ต้องผ่านการอาบแดด จากคุณสมบัติการผลิตชีวภัณฑ์ต่างๆ ของแบคทีเรียอะซิติกที่มีประโยชน์หลายชนิดนี้เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่อยู่บนผิวเยื่อเมมเบรนของเซลล์ เรียกว่า membrane-bound enzyme โดยเฉพาะเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ทำหน้าที่ในการออกซิไดส์สารตั้งต้นได้แก่แอลกอฮอล์หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งกระบวนการออกซิเดชันนี้จะทำให้เซลล์สามารถสร้างพลังงานเอทีพีสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ (Matsushita และคณะ, 1994) ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียอะซิติกอื่นๆ ได้แก่การนำมาผลิตเยื่อเซลลูโลส (Sheu และคณะ, 2000; Iguchi และคณะ, 2000) สามารถนำมาแปรรูปเป็นขนมหวาน กระดาษหรือภาชนะใส่อาหาร โดยสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการธรรมชาติได้อีกทางหนึ่งด้วย และยังสามารถผลิตโพลีแซคคาไรด์หลากหลายชนิดซึ่งคาดว่าจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางอาหารและการแพทย์ได้ (Moonmangmee และคณะ, 2002a, 2002b)

ในปัจจุบันเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสบนผิวเยื่อเมมเบรน (Membrane-bound dehydrogenase) ของแบคทีเรียอะซิติกสามารถนำมาใช้ในเทคโนโลยีด้าน Biosensor เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงและมีอัตราเร็วในการตรวจจับได้อย่างรวดเร็วมาก (Khan และคณะ, 1992; Kinnear และ Monbouquette, 1997; Darder และคณะ, 2000; Macauley และคณะ, 2001) จากความสำคัญของแบคทีเรียอะซิติกดังกล่าวข้างต้น การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับผลิตชีวภัณฑ์ชนิดต่างๆ ที่มีมูลค่าในเชิงธุรกิจการพาณิชย์เป็นสิ่งจำเป็นที่จะพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารและยาในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ทนร้อนซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต ได้แก่ กระแสไฟฟ้าและน้ำที่ใช้ในระบบหล่อเย็นของถังหมักซึ่งนับวันน้ำและไฟฟ้าจัดเป็นทรัพยากรที่หายากขึ้นทุกขณะ

Saeki และคณะ (1997) รายงานว่าในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียอะซิติกในปัจจุบันใช้สายพันธุ์ที่ไม่ทนร้อนและต้องควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการผลิตให้ได้ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมและเป็นอุณหภูมิที่สูงสุดของแบคทีเรียสายพันธุ์ mesophile สามารถเจริญได้ ถ้าหากระบบการควบคุมอุณหภูมิเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยอุณหภูมิในระบบการหมักเพิ่มสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย มีผลทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักได้ นอกจากนี้ Saeki และคณะ (1997) ยังได้รายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ทนร้อนในสกุล *Acetobacter* ที่สามารถเจริญได้ถึง 40 องศาเซลเซียส และพบคุณสมบัติดีเด่นในด้านการผลิตน้ำส้มสายชูได้สูงมากที่ 37 องศาเซลเซียส เทียบเท่ากับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

จากการสำรวจงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่ายังไม่มีรายงานการผลิตผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียอะซิติกที่อุณหภูมิสูง เช่นที่อุณหภูมิ 37 หรือ 40 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังไม่ได้มีการศึกษาถึงศักยภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจจากแบคทีเรียอะซิติกที่ค้นพบในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการใช้สายพันธุ์ทนร้อนที่นอกเหนือไปจากการรายงานของ Saeki และคณะ (1997) และการใช้ *Gluconobacter frateurii* สายพันธุ์ทนร้อนสำหรับผลิตน้ำตาลซอโบส ฟรุโกโตส อิริทริทอล และ cyclicketones ด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวและการใช้ resting cells ที่รายงานโดย Moonmangmee และคณะ (2000, 2001, 2002) อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวโดยเฉพาะการผลิตน้ำตาลซอโบสและน้ำตาลอิริทริทอลดังกล่าวเป็นการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการและไม่ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตในรูปแบบที่เหมาะสมอื่นๆ ที่จะสามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างสะดวกและเหมาะสม ดังนั้นเพื่อให้การประยุกต์ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีการศึกษารายละเอียดของกระบวนการผลิตรูปแบบใหม่ๆ ที่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการผลิตให้น้อยลง ในงานวิจัยนี้จะทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลซอโบสจากแหล่งธรรมชาติและสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 37-40 องศาเซลเซียส และทดลองการใช้ระบบของการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกในวัสดุตรึงชนิดอัลจิเนตเพื่อทำการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูง ทั้งนี้การตรึงเซลล์มีประโยชน์อย่างยิ่งในด้านความประหยัด สามารถลดต้นทุนการผลิตโดยสามารถนำเม็ดเจลกลั้มมาใช้ใหม่ได้อีกและสามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบปกติ และยังจะศึกษาถึงวิธีการผลิตเพื่อแก้ปัญหาปัจจัยในการผลิตต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้นได้น้ำตาลซอโบสที่ที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ผลผลิตสูงสุด เพราะจากการรายงานของ Giridhar และ Srivastava (2000) พบว่าสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินไปจะไปยับยั้งการผลิตน้ำตาลซอโบส และนอกจากนี้ยังจะศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ซอโบสดีไฮโดรจีเนสที่แยกได้จากแบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ทนร้อนที่

คัดเลือกได้ว่ามีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงสุดได้เท่าใด และศึกษาประสิทธิภาพตลอดจนความสามารถของเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตน้ำตาลซอโบสโดยการตรึงเอนไซม์

จากเอกสารงานวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียอะซิติกในสกุล *Gluconobacter* มีศักยภาพสูงในการผลิตน้ำตาลซอโบสเพื่อนำมาใช้ในการผลิตวิตามินซี และมีการปรับปรุงวิธีการผลิตอย่างต่อเนื่องจากอดีตถึงปัจจุบัน และพบว่ายังไม่มีรายงานได้ใช้แบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ที่นำกลับมาใช้ผลิตน้ำตาลซอโบสจากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ที่นำกลับมาใช้ในการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูงจะช่วยให้สามารถนำไปพัฒนาและ/หรือปรับปรุงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลชอโบสโดยวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์
2. คัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนที่สามารถผลิตน้ำตาลชอโบสที่อุณหภูมิสูงโดยวิธีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชอบิพอลดีไฮโดรจีเนสร่วมกับปริมาณน้ำตาลชอโบสที่ผลิตได้
3. ศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลชอโบสโดยใช้วิธีการตรึงเซลล์และการตรึงเอนไซม์ชอบิพอลดีไฮโดรจีเนสในวัสดุชนิดต่างๆ
4. ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลชอบิพอล อัตราการกวนและการให้อากาศ และการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ใหม่ ที่มีต่อการผลิตน้ำตาลชอโบสที่อุณหภูมิสูง

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกจากธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างดอกไม้ ผลไม้และอาหารหมักดองจากแหล่งต่างๆ นำมาแยกเชื้อโดยใช้อาหารเหลว Sorbitol-Ethanol Broth ปั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน นำมา streak ลงบนอาหารแข็งสูตรอาหารเดิมที่ผสม bromocresol purple เป็น indicator คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่สร้างกรดเป็นบริเวณสีเหลืองรอบๆ โคโลนี มาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง แล้วนำมาทดสอบเพื่อแบ่งกลุ่มเชื้อด้วยการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อยแกรม และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เช่นการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส การเกิดออกซิเดชันในอะซิเตทและแลคเตท การสร้างรงควัตถุในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างกรดในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท

2. การทดสอบการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ทั้งหมดลงในอาหารเหลว potato medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับให้ค่าความขุ่นของล้าเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) เท่ากับ 0.8 แล้วทำการถ่ายเชื้อใส่ลงในอาหารเหลว potato medium หลอดใหม่ ในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ นำหลอดอาหารไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3. การแยกโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียอะซิติก

ทำการแยกโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 36 ไอโซเลท โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว potato medium ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เก็บเซลล์และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย saline EDTA ที่ผสมไลโซไซม์และเอนไซม์ RNase นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที หลังจากเซลล์แตกจึงเติมด้วย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1/10 ของปริมาตรสารละลายเซลล์เริ่มต้น และเติม CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 0.7M NaCl ลง 1/10 ของปริมาตรสารละลายเซลล์เริ่มต้น นำไปปั่นเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ที่ผสมเอนไซม์ RNase ทำการตรวจสอบโครโมโซมโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 0.8% ในบัฟเฟอร์ 1xTAE

4. การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA intergenic spacer (ITS) จากโครโมโซม

ทำการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA intergenic spacer ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 16S rDNA (1522-1540 on 16S rDNA): 5'-TGCGG(C/T)TGGATCACCTCCT-3' และไพรเมอร์ 23S rDNA 38-22 on 23S rDNA): 5'-GTGCC(A/T)AGGCATCCACCG-3' ร่วมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Takara Ex Tag kit (TaKaRa BIO INC, Japan) ประกอบด้วย 10xTakara Ex Taq buffer, 2.5 mM dNTPs mix โดยใช้เอนไซม์ Takara Ex Taq

polymerase เติมสารละลายโครโมโซมตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดปฏิกิริยา PCR ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้สารผสมตกลงมาที่ก้นหลอด หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง DNA Thermal cycler 2400 (GeneAmp® PCR system 2400: Applied Biosystems) เพื่อเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA intergenic spacer โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลีเมอเรส ดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นที่ 2 จำนวน 25 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 3 elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และขั้นที่ 4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลีเมอเรสด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ agarose 2.5% ในบัฟเฟอร์ 1xTAE

5. การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S-23S rDNA intergenic spacer

นำผลผลิตของปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลีเมอเรสที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen®) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยไพโรเมอริซัดเตียวก้นกับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S-23S rDNA intergenic spacer โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ ABI Prism™ 310 ร่วมกับการใช้ BigDye™ Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) และ Ampli Taq® DNA Polymerase FS จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

6. การทดสอบการผลิตน้ำตาลซอร์บิตอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ปลูกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทั้งหมดที่สามารถเจริญได้ที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว potato medium เชย้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.8 หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว sorbitol medium ที่มี sorbitol ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract และ peptone ความเข้มข้นอย่างละ 0.3 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชย้าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซอร์บิตอลด้วยวิธีทางเคมีใช้ resorcinol ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลคีโตสที่ได้ในสารละลาย โดยการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อลงในสารละลาย resorcinol แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำหลอดทดสอบมาวางให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำตาลซอร์บิตอลมาตรฐาน

7. การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสในเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่หมัก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่หมักทั้งหมด 36 ไอโซเลต ลงในอาหารเหลวที่มี sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วย potassium phosphate buffer พีเอช 6.5 จำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์

ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง French Pressure Cell Press ที่ความดัน 16,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จำนวน 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกตะกอนเซลล์ทิ้งที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี ferricyanide reductase assay และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ผลการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์จะแสดงในรูปของกิจกรรมจำเพาะ ทั้งนี้กำหนด 1 หน่วย (ยูนิต) ของเอนไซม์ซอบิทอลดีไฮโดรจีเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์สับสเตรทโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นซอบอส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

8. การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอบิทอลดีไฮโดรจีเนส

8.1 การแยกส่วนของเซลล์เมมเบรนจากเซลล์แบคทีเรียอะซิติก

ปลูกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลทที่ให้ผลผลิตน้ำตาลซอบอสสูงที่สุดลงในอาหารเหลว sorbitol medium ที่มี sorbitol ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และทำให้เซลล์แตกเช่นเดียวกับข้อ 7 นำสารละลายปราศจากเซลล์มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเมมเบรน ด้วยความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2 การตรวจสอบ prosthetic group ของเอนไซม์

นำส่วน membrane suspension ที่ปรับปริมาณโปรตีนได้ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 500 mM EDTA (ethylenediamine-N,N,N',N'-tetracetic acid, disodium salt) หลังจากนั้นทำการบ่มเป็นเวลา 30 นาที พร้อมกับการกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการหมุนเหวี่ยงแยกชั้นของเมมเบรนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งไป ละลายเมมเบรนด้วย 20 mM Tris-HCl pH 7.5 เพื่อชะเอา EDTA ส่วนเกินออก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บเมมเบรนที่ความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่งเพื่อชะเอา EDTA ออกให้หมด การทำ reactivation เอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ phenylethanol ได้จากเมมเบรนที่ treat ด้วย EDTA แล้วด้วยการเติมสารละลาย 5 μ M pyrroloquinoline quinine (PQQ) และ 5 mM calcium chloride ลงไปใน membrane suspension แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการวิเคราะห์กิจกรรมด้วยวิธี ferricyanide reductase assay

8.3 การละลายเอนไซม์ซอบิทอลดีไฮโดรจีเนสออกจากเมมเบรน

นำตะกอนเมมเบรนมาละลายใน 5 mM potassium phosphate buffer พีเอช 6.5 แล้วทำการปรับปริมาณโปรตีนให้ได้ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการละลายโปรตีนออกจากเมมเบรนด้วยดีเทอเจนท์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะการกวนช้าๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.4 การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์

8.4.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด โดยการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี Ferricyanide reductase assay ใช้บัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือบัฟเฟอร์

MacIlvaine (0.2 M disodium hydrogen phosphate.12H₂O, 0.1 M citric acid) พีเอช 3-8 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Glycine-NaOH (0.1 M glycine, 0.1 M sodium hydroxide) พีเอช 8.5-10

8.4.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์บริสุทธิ์ในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ

บ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ดังนี้ 10 mM Glycine, 10 mM Tris-HCl และ 10 mM acetate buffer ทำการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ในบัฟเฟอร์ดังกล่าวเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

8.4.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์บริสุทธิ์ต่อความร้อน

ปิเปตเอนไซม์บริสุทธิ์ใส่หลอดแก้วขนาดเล็ก ปิดฝาหลอด นำแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 25-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำหลอดเอนไซม์มาแช่น้ำแข็งทันที แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมที่เหลืออยู่ของเอนไซม์บริสุทธิ์

8.4.4 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์บริสุทธิ์

ปิเปตสับสเตรทประเภทน้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 M ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ McIlvaine พีเอช 5.0 และเอนไซม์บริสุทธิ์ลงไป แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ คำนวณกิจกรรมเอนไซม์เปรียบเทียบความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์

8.4.5 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE

เอนไซม์ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE ทำการเตรียม slab gel โดยใช้ความเข้มข้นของ stacking gel ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ resolving gel ที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (Laemmli, 1970) ก่อนที่จะทำการหยอดเอนไซม์ลงไปในเจล นำตัวอย่างเอนไซม์มาใส่ SDS ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ 0.1 mM dithiothreitol ลงไป แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้โปรตีนมาตรฐานเพื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการทราบ ดังนี้ phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa) และ soybean trypsin inhibitor (21.1 kDa) ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 50 โวลต์ หลังจากนั้นแกะแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue (CBB R-250)

9. การตรึงเซลล์และการตรึงเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสในอัลจิเนต

9.1 วิธีการตรึงเซลล์

ปลูกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 6 ลงในอาหารเหลว sorbitol medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย 20 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งน้ำหนักเซลล์ที่ได้ 1 ส่วน (10^7 - 10^9 cfu/ml) ผสมกับ 2 ส่วนของโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นำสารละลายที่ผสมแล้วนำไปทำให้เกิดเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตโดยการหยดสารละลายที่ได้ลงไปบนสารละลาย CaCl₂ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นและกวนเบาๆ ตลอดเวลา หลังจากนั้นกวนทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดเป็นเม็ดเจลที่สมบูรณ์ นำเม็ดเจลที่ได้มาล้างในบัฟเฟอร์ 5 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 จำนวน 3-4 ครั้ง จนกระทั่งบัฟเฟอร์ใส จึงนำเม็ดเจลไปใช้เพื่อการผลิตน้ำตาลซอโบสต่อไป

9.2 วิธีการตรึงเอนไซม์ในแคลเซียมอัลจิเนต

นำหนึ่งส่วนของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์ (ความเข้มข้นของโปรตีน 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือส่วนของเยื่อหุ้มเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทันทันที่คัดเลือกได้ (ความเข้มข้นของโปรตีน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผสมอยู่ในบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 มาผสมกับ 2 ส่วนของโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นำสารละลายที่ผสมแล้วนำไปทำให้เกิดเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตโดยการหยดสารละลายที่ได้ลงไปนในสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นและกวนเบาๆ ตลอดเวลา หลังจากนั้นกวนทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อก่อให้เกิดเป็นเม็ดเจลที่สมบูรณ์ นำเม็ดเจลที่ได้มาล้างในบัฟเฟอร์ 5 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 จำนวน 3-4 ครั้ง นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างเม็ดเจลมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งได้ค่า $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ น้อยกว่า 0.05 จึงนำเม็ดเจลไปใช้เพื่อการผลิตน้ำตาลซอโบสต่อไป

9.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลซอโบส

9.3.1 ความคงตัวของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตต่อการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูง

นำเม็ดอัลจิเนตที่ตรึงเอนไซม์หรือเซลล์จากข้อ 9.1 และ 9.2 ใส่ลงในสารละลายซอพิทอลที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ใน 10 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 ในอัตราเม็ดเจล 1 ส่วน ต่อสารละลายซอพิทอล 1 ส่วน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการกวนให้อากาศ 50 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำตาลซอโบสทุกๆ 6 ชั่วโมง

9.3.2 อัตราการกวนให้อากาศ

ผสมเม็ดอัลจิเนตที่ตรึงเอนไซม์หรือเซลล์ 1 ส่วน กับสารละลายซอพิทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ใน 10 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 อีก 1 ส่วน ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 9.3.1 ภายใต้สภาวะการกวนให้อากาศที่ 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำตาลซอโบสทุกๆ 6 ชั่วโมง

9.3.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอล

ศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลต่อการผลิตน้ำตาลซอโบส โดยการเตรียมสารละลายซอพิทอลความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ใน 10 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ส่วน ผสมกับเม็ดอัลจิเนตที่ตรึงเซลล์หรือเอนไซม์อีก 1 ส่วน นำไปบ่มในสภาวะของอุณหภูมิและการกวนให้อากาศที่คัดเลือกจากข้อ 9.3.1 และ 9.3.2 เก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำตาลซอโบสทุกๆ 6 ชั่วโมง

9.3.4 การทดสอบการนำเม็ดอัลจิเนตกลับมาใช้ใหม่

นำเม็ดอัลจิเนตที่ตรึงเอนไซม์หรือเซลล์ที่ผ่านการผลิตน้ำตาลซอโบสในสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 9.3.1-9.3.3 มาทำการผลิตซ้ำใหม่ในสภาวะดังกล่าว และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ผลิตได้ในแต่ละรอบของการผลิต

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกจากธรรมชาติและการทดสอบการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกจากธรรมชาติ (ดอกไม้ ผลไม้ อาหารหมัก) พบเชื้อจำนวน 75 ไอโซเลต ลักษณะทางสัณฐานเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด มีรูปร่างท่อนสั้น กระจายตัวแบบเดี่ยว หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์อะซิเตเลส เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ทั้งหมดนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว potato medium แล้วบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คัดเลือกแบคทีเรียอะซิติกที่เจริญในอาหารเหลวได้และให้ค่า OD₆₀₀ มากกว่า 0.8 จากการทดสอบพบเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทั้งหมด 36 ไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี (ตารางที่ 1) การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *Acetobacter* จำนวน 5 ไอโซเลต *Gluconobacter* จำนวน 22 ไอโซเลต และ *Gluconacetobacter* จำนวน 9 ไอโซเลต (ตารางที่ 2-5) โดยมีผลสรุปจากการทดสอบคุณลักษณะดังต่อไปนี้ กลุ่ม *Acetobacter* ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ไม่สร้างไดไฮดรอกซีอะซิโตน สร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดกลูโคส แมนโนส ซาโลสและเอธานอล ไม่พบการสร้างกรดจากอะราบิโนส ซูโครส มอลโตส ซอบิทอล และแมนนิทอล จากลักษณะดังกล่าวพบว่ามีคล้ายคลึงกับ *A. pasteurianus* กลุ่ม *Gluconobacter* ทั้ง 22 ไอโซเลต มีคุณลักษณะดังนี้ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ สามารถสร้างไดไฮดรอกซีอะซิโตน สร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส เอธานอล ซอบิทอล แมนนิทอล ดี-อะราบิทอล และแอล-อะราบิทอล ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *G. frateurii* สำหรับกลุ่ม *Gluconacetobacter* จำนวน 9 ไอโซเลต มีคุณลักษณะดังนี้สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ สามารถสร้างไดไฮดรอกซีอะซิโตน สร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดกลูโคสและเอธานอล ไม่สร้างกรดจากฟรุคโตส กาแลคโตส ซูโครส เมลิไบโอส ซอบิทอลและแมนนิทอล ตรวจพบการสร้าง 2-keto-D-gluconate และ 5-keto-D-gluconate ในทุกไอโซเลตของ *Gluconacetobacter* ที่แยกได้ ลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *Ga. xylinus*

ตารางที่ 1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มาของเชื้อ	การเจริญ (OD ₆₀₀)	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มาของเชื้อ	การเจริญ (OD ₆₀₀)	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มาของเชื้อ	การเจริญ (OD ₆₀₀)
KMUTT 1	เงาะ	1.53	KMUTT 26	ขนุน	1.65	KMUTT 51	น้ำตาลสด	1.32
KMUTT 2	ลำไย	1.37	KMUTT 27	ขนุน	0.04	KMUTT 52	ข้าวหมาก	0.94
KMUTT 3	ลำไย	0.05	KMUTT 28	ลองกอง	1.42	KMUTT 53	ข้าวหมาก	0.99
KMUTT 4	ลำไย	0.01	KMUTT 29	สับปะรด	0.98	KMUTT 54	ข้าวหมาก	0.89
KMUTT 5	องุ่น	1.63	KMUTT 30	สับปะรด	1.52	KMUTT 55	ข้าวหมาก	0.60
KMUTT 6	องุ่น	0.34	KMUTT 31	ขนุน	0.51	KMUTT 56	ข้าวหมาก	1.09
KMUTT 7	ละมุด	0.08	KMUTT 32	มะเฟือง	0.01	KMUTT 57	ข้าวหมาก	1.23
KMUTT 8	ละมุด	1.12	KMUTT 33	มะเฟือง	0.89	KMUTT 58	ข้าวหมาก	1.49
KMUTT 9	ละมุด	0.92	KMUTT 34	ชมพู	0.71	KMUTT 59	ข้าวหมาก	0.54
KMUTT 10	แตงโม	0.29	KMUTT 35	ชมพู	1.41	KMUTT 60	ขนมจีน	0.01
KMUTT 11	สับปะรด	0.39	KMUTT 36	กล้วย	0.08	KMUTT 61	ขนมจีน	0.69
KMUTT 12	สับปะรด	1.29	KMUTT 37	กล้วย	0.06	KMUTT 62	ขนมจีน	0.09
KMUTT 13	สับปะรด	0.97	KMUTT 38	ดอกลิลลี่	0.31	KMUTT 63	ข้าวหมาก	1.14
KMUTT 14	ฝรั่ง	0.47	KMUTT 39	ดอกลิลลี่	1.47	KMUTT 64	ข้าวหมาก	0.02
KMUTT 15	ฝรั่ง	1.54	KMUTT 40	ดอกชบา	1.36	KMUTT 65	ข้าวหมาก	0.43
KMUTT 16	องุ่น	0.00	KMUTT 41	ดอกกล้วย	0.02	KMUTT 66	ข้าวหมาก	1.38
KMUTT 17	องุ่น	0.05	KMUTT 42	ดอกมะเฟือง	1.21	KMUTT 67	สาโท	1.25
KMUTT 18	ลองกอง	1.30	KMUTT 43	ดอกมะเฟือง	0.62	KMUTT 68	สาโท	0.37
KMUTT 19	ลองกอง	0.67	KMUTT 44	ดอกพลับพลึง	0.88	KMUTT 69	สาโท	0.04
KMUTT 20	ลองกอง	0.51	KMUTT 45	ดอกลิลลี่	0.03	KMUTT 70	สาโท	0.57
KMUTT 21	แอปเปิ้ล	1.44	KMUTT 46	ดอกลิลลี่	1.48	KMUTT 71	สาโท	1.41
KMUTT 22	แอปเปิ้ล	1.59	KMUTT 47	ดอกลิลลี่	1.54	KMUTT 72	สาโท	0.49
KMUTT 23	น้อยหน่า	0.03	KMUTT 48	ดอกมะยม	0.55	KMUTT 73	สาโท	0.04
KMUTT 24	น้อยหน่า	1.55	KMUTT 49	น้ำอ้อยสด	0.64	KMUTT 74	สาโท	0.00
KMUTT 25	แตงโม	0.64	KMUTT 50	น้ำอ้อยสด	1.17	KMUTT 75	สาโท	0.07

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนเปรียบเทียบกับ *Acetobacter* สายพันธุ์มาตรฐาน

Characteristics	Five isolates of acetic acid bacteria	<i>A. tropicalis</i> ^(a,b)	<i>A.pasteurianus</i> ^(a,b,d)	<i>A. aceti</i> ^(a,b,c,d)	<i>A. lovaniensis</i> ^(a,b)
Oxidation of Acetate	+	+	+	+	+
Oxidation of Lactate	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	-	-	-	+	-
Ubiquinone system	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9
Acid production from:					
D-glucose	+	+	W	+	+
L-arabinose	-	-	-	+	nd
D-fructose	+/-	-	-	w	-
D-galactose	+/-	+	w	+	nd
D-mannose	+	+	-	+	nd
Sucrose	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	w	+	nd
Maltose	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+
D-sorbitol	-	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	-	-

Abbreviations : +, positive; -, negative; w, weak; nd, not determined.

^aData were cited from Lisdiyanti, et al. (2000), ^bData were cited from Lisdiyanti, et al. (2001), ^cData were cited from De Ley, et al. (1984), ^dSievers and Swings (2005)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนเปรียบเทียบกับ *Gluconobacter* สายพันธุ์มาตรฐาน

Characteristics	Twenty two isolates of acetic acid bacteria	<i>G. frateurii</i> ^(b)	<i>G. cerinus</i> ^(b)	<i>G. oxydans</i> ^(b)	<i>G. thailandicus</i> ^(a)
Oxidation of Acetate	-	-	-	-	-
Oxidation of Lactate	-	-	-	-	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+
Ubiquinone system	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10
Acid production from:					
D-glucose	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	W	-
Sucrose	+/-	+	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	-
Ethanol	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	-
D-mannitol	+	+	+	+	+
D-arabitol	+	+	+	-	+
L-arabitol	+	+	-	-	W

Abbreviations : +, positive; -, negative; w, weak; nd, not determined.

^aData were cited from Tanasupawat, et al. (2004); ^bData were cited from Yukphan, et al. (2004)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนเปรียบเทียบกับ *Gluconacetobacter* สายพันธุ์มาตรฐาน

Characteristics	Nine isolates of acetic acid bacteria	<i>Ga. xylinus</i> ^(a)	<i>Ga. liquefaciens</i> ^(b)	<i>Ga. hansenii</i> ^(c)
Oxidation of Acetate	+	+	+	+
Oxidation of Lactate	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+
Water-soluble brown pigment	-	-	+	-
Ubiquinone system	Q10	Q10	Q10	Q10
Acid production from:				
D-glucose	+	+	+	+
D-fructose	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Melibiose	-	nd	-	nd
Ethanol	+	+	+	+
D-sorbitol	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	-
Glycerol	-	-(w)	+	+
2-Keto-D-gluconic acid	+	+	+	+
5-Keto-D-gluconic acid	+	+	+	+

Abbreviations : +, positive; -, negative; w, weak; nd, not determined. +

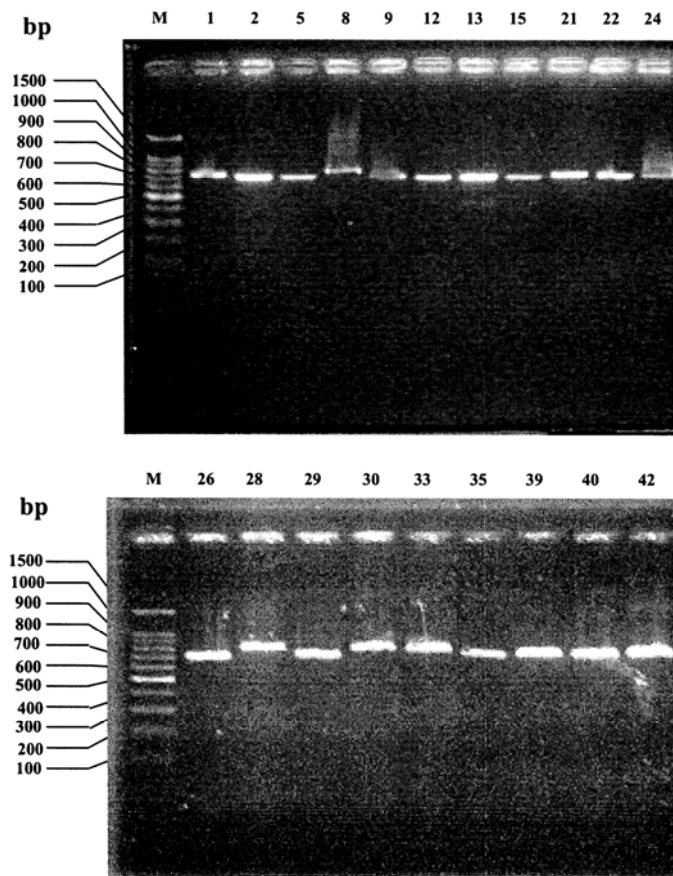
^aData were cited from Toyosaki et al. (1995), ^bData were cited from Seearunruangchai et al. (2004), ^cData were cited from Lisdiyanti et al. (2006)

ตารางที่ 5 สรุปการจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนจากการใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี

รหัสเชื้อ	การจำแนก	รหัสเชื้อ	การจำแนก
KMUTT 1	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 51	<i>Gluconobacter</i>
KMUTT 2	<i>Acetobacter</i>	KMUTT 52	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 5	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 53	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 8	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 54	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 9	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 56	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 12	<i>Acetobacter</i>	KMUTT 57	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 13	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 58	<i>Acetobacter</i>
KMUTT 15	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 63	<i>Acetobacter</i>
KMUTT 18	<i>Acetobacter</i>	KMUTT 66	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 21	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 67	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 22	<i>Gluconobacter</i>	KMUTT 71	<i>Gluconacetobacter</i>
KMUTT 24	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 26	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 28	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 29	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 30	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 33	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 35	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 39	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 40	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 42	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 44	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 46	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 47	<i>Gluconobacter</i>		
KMUTT 50	<i>Gluconacetobacter</i>		

2. การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA intergenic spacer (ITS) จากโครโมโซมและการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส

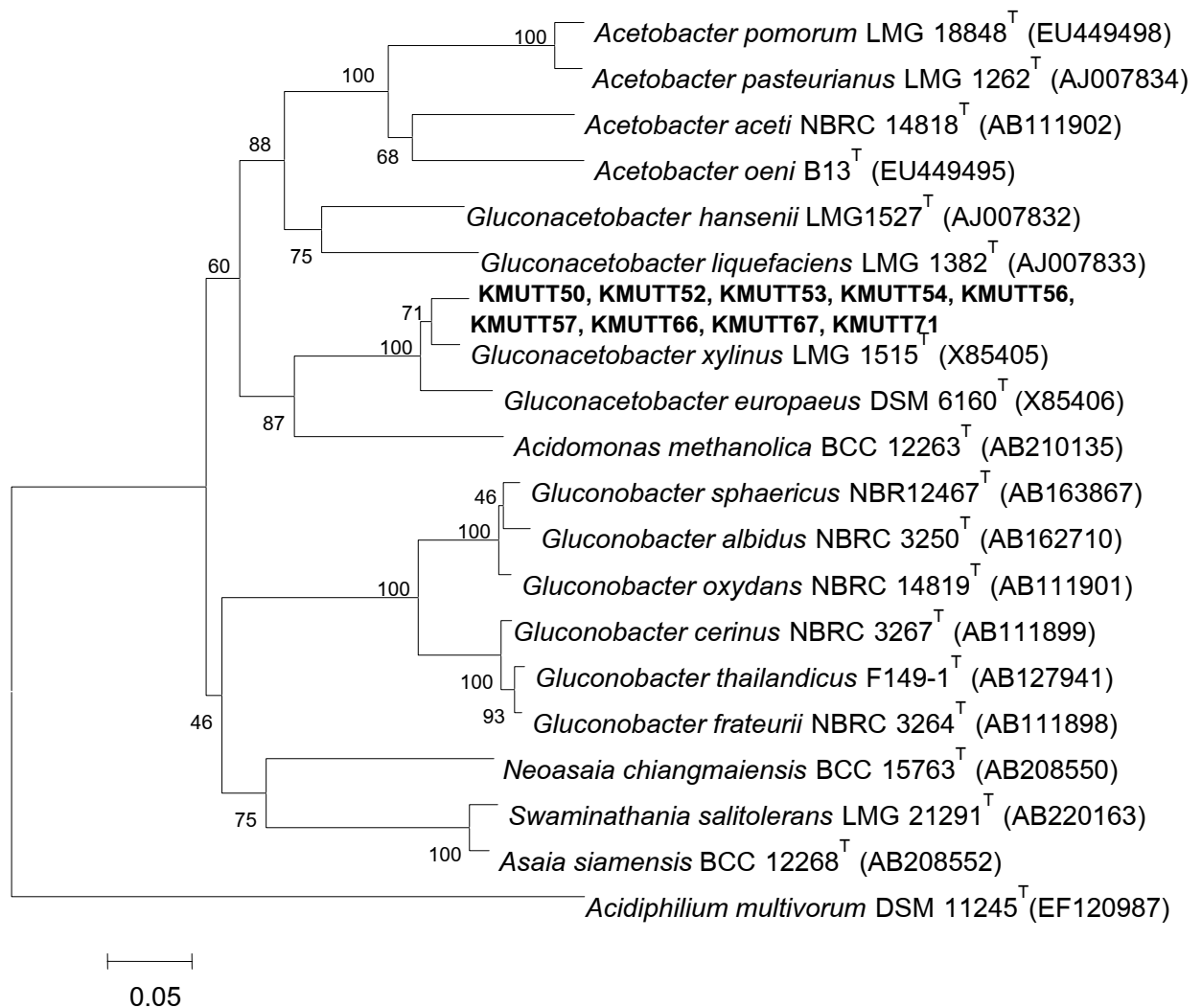
ผลการทดลองการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA intergenic spacer (ITS) จากโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทหรือนจำนวน 36 ไอโซเลต ด้วยไพรเมอร์ 16S rDNA (1522-1540 on 16S rDNA): 5'-TGCGG(C/T)TGGATCACCTCCT-3' และไพรเมอร์ 23S rDNA 38-22 on 23S rDNA): 5'-GTGCC(A/T)AGGCATCCACCG-3' พบว่าเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทหรือนให้ผลผลิตของแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 700-900 เบส ดังแสดงในรูปที่ 1



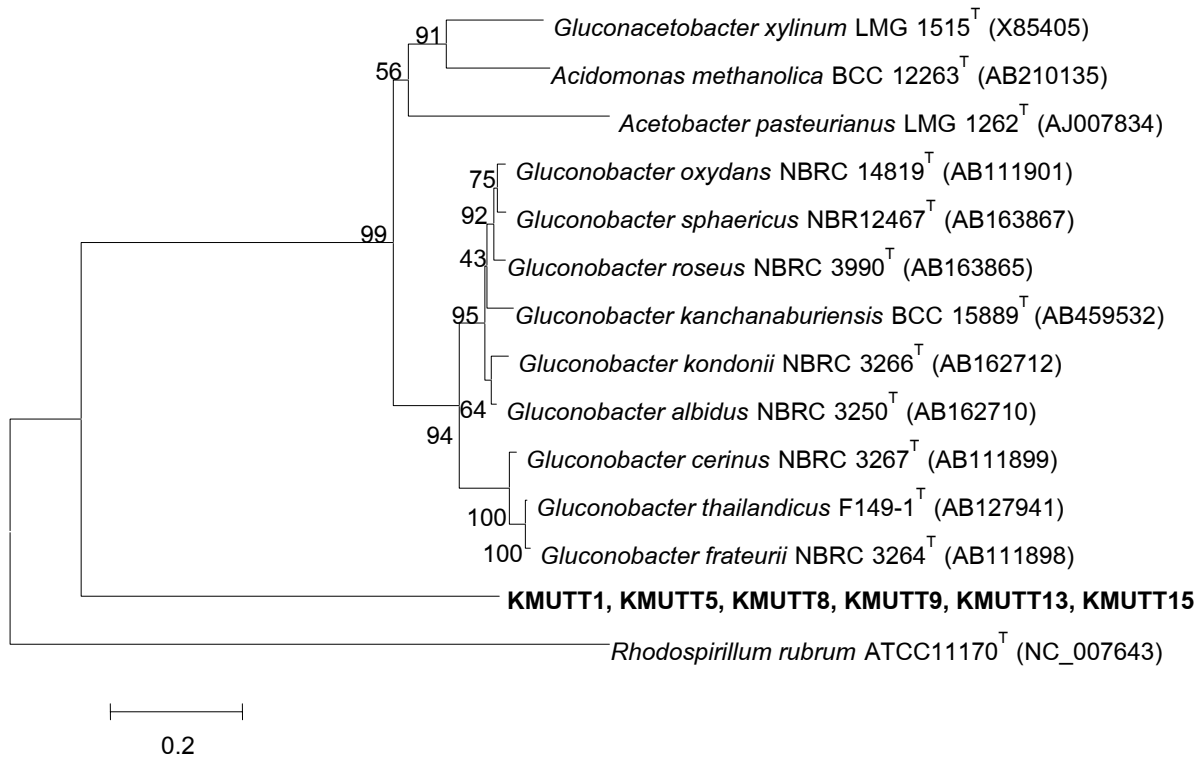
รูปที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกลูโซโฟลีเมอเรสด้วย agarose gel electrophoresis

สัญลักษณ์	M	1 kb DNA ladder	24	KMUTT 24
	1	KMUTT 1	26	KMUTT 26
	2	KMUTT 2	28	KMUTT 28
	5	KMUTT 5	29	KMUTT 29
	8	KMUTT 8	30	KMUTT 30
	9	KMUTT 9	33	KMUTT 33
	12	KMUTT 12	35	KMUTT 35
	13	KMUTT 13	39	KMUTT 39
	15	KMUTT 15	40	KMUTT 40
	21	KMUTT 21	42	KMUTT 42
	22	KMUTT 22		

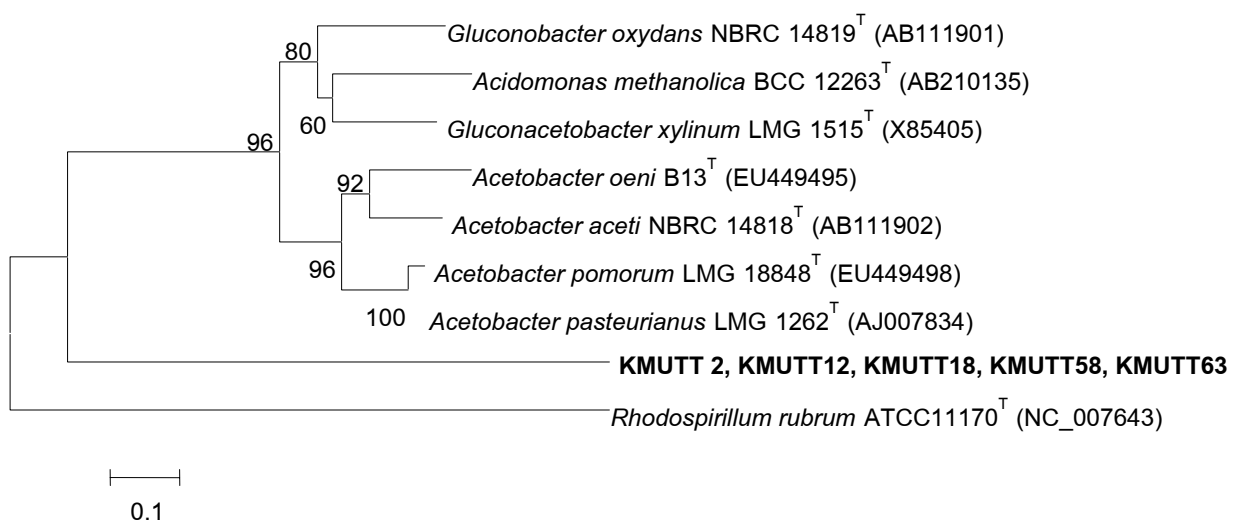
จากการนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA intergenic spacer (ITS) จากแบคทีเรียอะซิติกทอนร่อนที่แยกได้ไป BLAST กับฐานข้อมูลลำดับเบสใน www.ncbi.nlm.nih.gov พบว่าผลของการวิเคราะห์ให้ผลตรงกันกับแต่ละกลุ่มแบคทีเรียอะซิติกที่ใช้วิธีการจัดกลุ่มด้วยวิธีการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดย *Gluconacetobacter* จำนวน 9 ไอโซเลต จำแนกได้เป็น *Gluconacetobacter xylinus* (รูปที่ 2) โดยมีความเหมือนของลำดับเบสของ 16S-23S rDNA เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน สำหรับกลุ่มของ *Gluconobacter* จำนวนทั้งหมด 22 ไอโซเลต จำแนกเป็น *Gluconobacter frateurii* (รูปที่ 3) โดยมีความเหมือนของลำดับเบสของ 16S-23S rDNA เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน สำหรับกลุ่มของ *Acetobacter* ทั้ง 5 ไอโซเลต เป็น *Acetobacter pasteurianus* (รูปที่ 4)



รูปที่ 2 Neighbor-joining-tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลต KMUTT50, KMUTT52, KMUTT53, KMUTT54, KMUTT56, KMUTT57, KMUTT66, KMUTT67 และ KMUTT71 โดยใช้ 16S-23S ITS



รูปที่ 3 Neighbor-joining-tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลท KMUTT1, KMUTT5, KMUTT8, KMUTT9, KMUTT13 และ KMUTT15 โดยใช้ 16S-23S ITS



รูปที่ 4 Neighbor-joining-tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลท KMUTT2, KMUTT12, KMUTT18, KMUTT58 และ KMUTT63 โดยใช้ 16S-23S ITS

3. การทดสอบการผลิตน้ำตาลซอโบสและกิจกรรมของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนส

จากการทดลองการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรทในการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะให้อากาศ พบว่าแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนเฉพาะกลุ่มของ *Gluconobacter frateurii* จำนวน 22 ไอโซเลตสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้ในปริมาณแตกต่างกันคือผลิตอยู่ในช่วงระหว่าง 41-98 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอโบสที่ผลิตขึ้นในระหว่างวันที่ 1-3 ของการเลี้ยงเชื้อมีการสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปริมาณไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละไอโซเลต เชื้อแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนไอโซเลต KMUTT26 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูงถึง 95-98 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน และจากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจากส่วนของ cell-free extract ของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนแต่ละไอโซเลต พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในช่วงระหว่าง 0.58-0.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนไอโซเลต KMUTT 26 ให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด 0.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 6) ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนไอโซเลต KMUTT 26 ไว้สำหรับการทดลองผลิตน้ำตาลซอโบสและศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสต่อไป

4. ผลการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจากเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อน *Gluconobacter frateurii* KMUTT 26

4.1 ผลการตรวจหา prosthetic group และผลิตภัณฑ์ออกซิเดทีฟของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนส

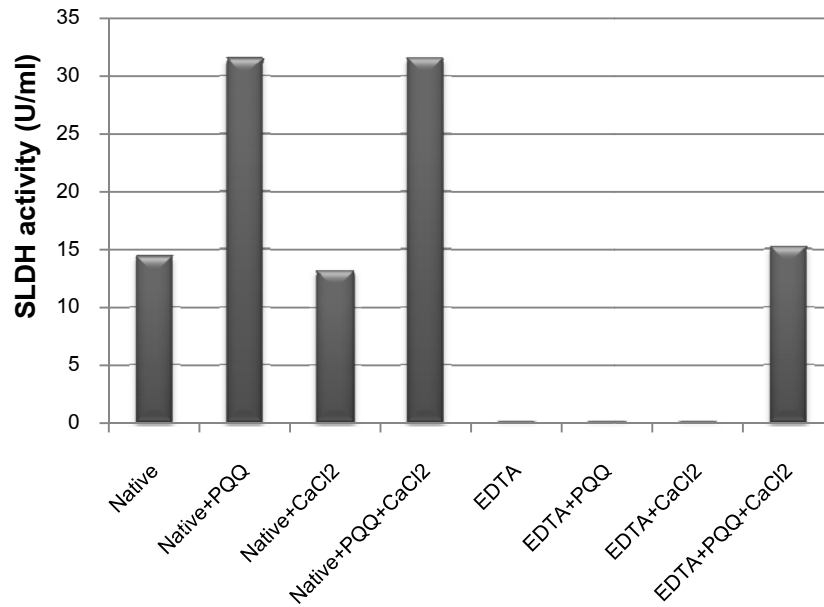
การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์หลังจากการบ่มเมมเบรนของ *G. frateurii* KMUTT 26 ด้วย EDTA แล้วเติมสารละลาย PQQ ความเข้มข้น 5 μ M และ/หรือ CaCl_2 ความเข้มข้น 5 mM แล้วทำการบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบกับเมมเบรนที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วย EDTA พบว่าในส่วนของเมมเบรนที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วย EDTA มีกิจกรรมของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนส 14 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นถึง 31 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อมีการเติมสารละลาย PQQ และจากการเติม CaCl_2 เพียงอย่างเดียวไม่มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น เมมเบรนเมื่อบ่มด้วยสารละลาย EDTA ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ ถึงแม้ว่าจะมีการเติม PQQ หรือ CaCl_2 จากการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมสารละลาย PQQ และ CaCl_2 ลงในเมมเบรนพบกิจกรรมเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นเท่ากับกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นที่อยู่ในเมมเบรน ดังนั้น prosthetic group ของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจึงเป็น PQQ (รูปที่ 5)

จากการนำสารละลายเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อน *G. frateurii* KMUTT 26 ที่ไม่ผ่านและผ่านการบ่มด้วย EDTA และ PQQ/ CaCl_2 มาหาผลิตภัณฑ์ออกซิเดทีฟโดยการเติมสารละลายซอพิทอล ความเข้มข้น 100 μ M ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ทำการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงในสภาวะให้อากาศ หลังจากการปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของตะกอนเมมเบรนและส่วนใส นำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ออกซิเดทีฟด้วยวิธี thin layer chromatography โดยใช้น้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลซอโบสมาตรฐานเป็นสารอ้างอิง ผลการทดลองไม่พบผลิตภัณฑ์ออกซิเดทีฟใดๆ ในสภาวะของสารละลายเมมเบรนที่บ่มด้วย EDTA กับสับสเตรท

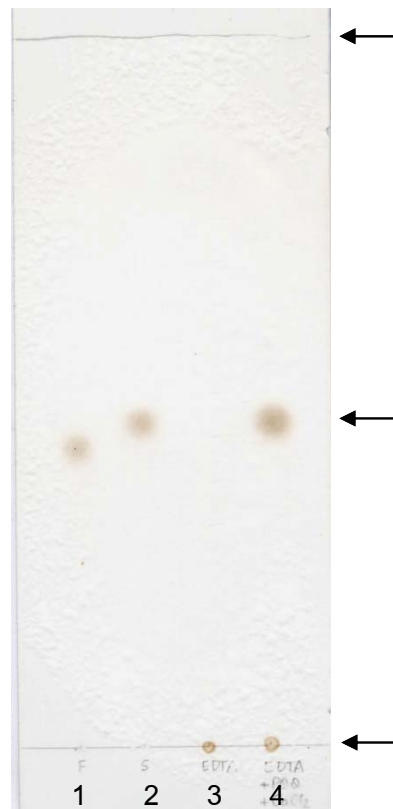
แต่สำหรับในสภาวะสารละลายเมมเบรนที่ป่มด้วย EDTA และมีการเติม PQQ/CaCl₂ พบน้ำตาลซอโบสเป็นผลิตภัณฑ์ออกซิเดทีฟของซอบิทอล (รูปที่ 6)

ตารางที่ 6 การผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและกิจกรรมเอนไซม์ซอบิทอลดีไฮโดรจีเนสของแบคทีเรียอะซิติกแต่ละไอโซเลต

รหัสเชื้อ	น้ำตาลซอโบสที่ผลิตได้ (%)			กิจกรรมเอนไซม์ (U/mg)
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	
KMUTT 1	41	55	68	0.71
KMUTT 5	90	92	95	0.82
KMUTT 8	53	69	75	0.80
KMUTT 9	45	51	66	0.68
KMUTT 13	84	90	91	0.83
KMUTT 15	91	95	95	0.94
KMUTT 21	43	64	78	0.58
KMUTT 22	49	73	86	0.71
KMUTT 24	77	87	95	0.86
KMUTT 26	95	97	98	0.97
KMUTT 28	51	69	78	0.75
KMUTT 29	43	59	74	0.68
KMUTT 30	75	87	90	0.88
KMUTT 33	49	73	86	0.79
KMUTT 35	50	59	74	0.84
KMUTT 39	66	79	87	0.76
KMUTT 40	70	85	94	0.93
KMUTT 42	61	73	89	0.85
KMUTT 44	42	57	69	0.81
KMUTT 46	84	94	95	0.94
KMUTT 47	73	88	90	0.88
KMUTT 51	73	81	91	0.91



รูปที่ 5 ผลของ PQQ และ CaCl₂ ต่อกิจกรรมเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนส

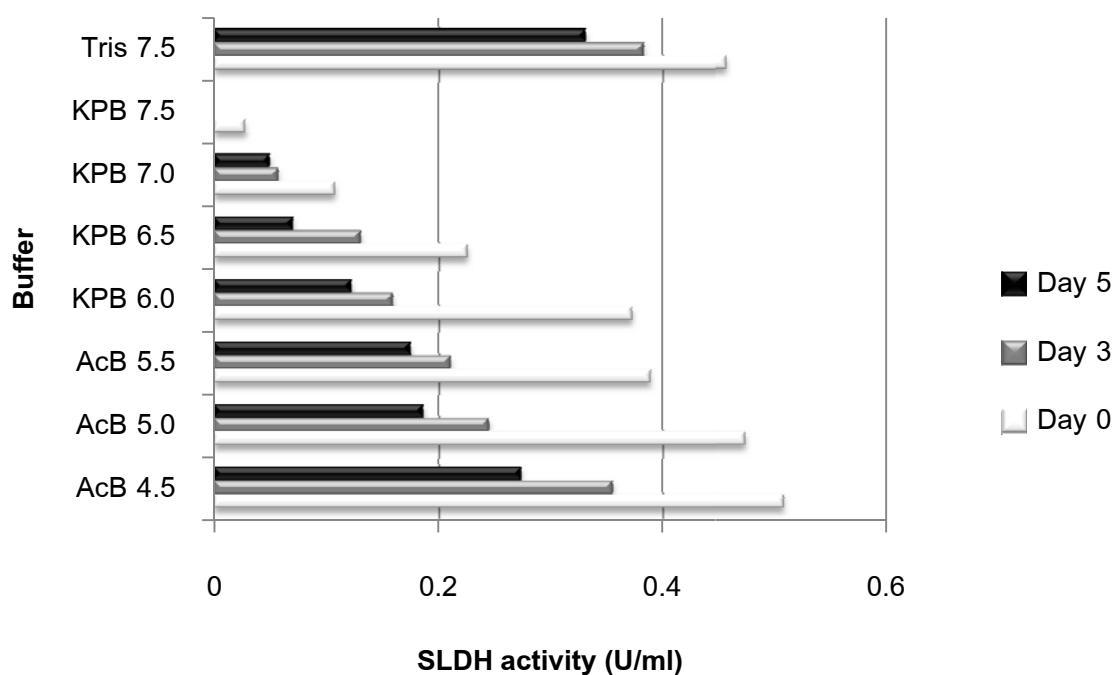


รูปที่ 6 ผลิตภัณฑ์ออกซิเดทีฟของเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนส

เลนที่ 1 น้ำตาลฟรุกโทสมาตรฐาน, เลนที่ 2 น้ำตาลซอโบสมาตรฐาน, เลนที่ 3 เมมเบรนที่ป่มด้วย EDTA, เลนที่ 4 เมมเบรนที่ป่มด้วย EDTA ผสมกับ PQQ และ CaCl₂

4.2 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช

จากการนำส่วนเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทอนร็อน *G. frateurii* KMUTT26 มาบ่มในบัฟเฟอร์ ตั้งแต่พีเอช 4.5 ถึง 7.5 ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน ได้แก่ อะซิเตทบัฟเฟอร์ โปแตสเซียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทริสบัฟเฟอร์ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสในวันแรก มีกิจกรรมสูงในอะซิเตทและทริสบัฟเฟอร์ สำหรับโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าอะซิเตทและทริสบัฟเฟอร์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเอนไซม์ในวันที่ 3 พบกิจกรรมเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสในทริสบัฟเฟอร์สูงที่สุด 0.39 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์เมื่อบ่มในอะซิเตทบัฟเฟอร์ในทุกๆ พีเอชที่ทดสอบลดลงไปประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เลยในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 หลังจากการบ่มต่อเนื่องถึงวันที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์ยังพบสูงสุดในเอนไซม์ที่บ่มไว้ในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 โดยยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์สูง 0.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงไปจากวันแรก 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ในอะซิเตทและโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลดลงตามลำดับ โดยเฉพาะกิจกรรมเอนไซม์ลดน้อยลงอย่างมากเมื่อบ่มเอนไซม์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งแต่พีเอช 6.5 ถึง 7.5 (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ความเสถียรของเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสที่พีเอชต่างๆ

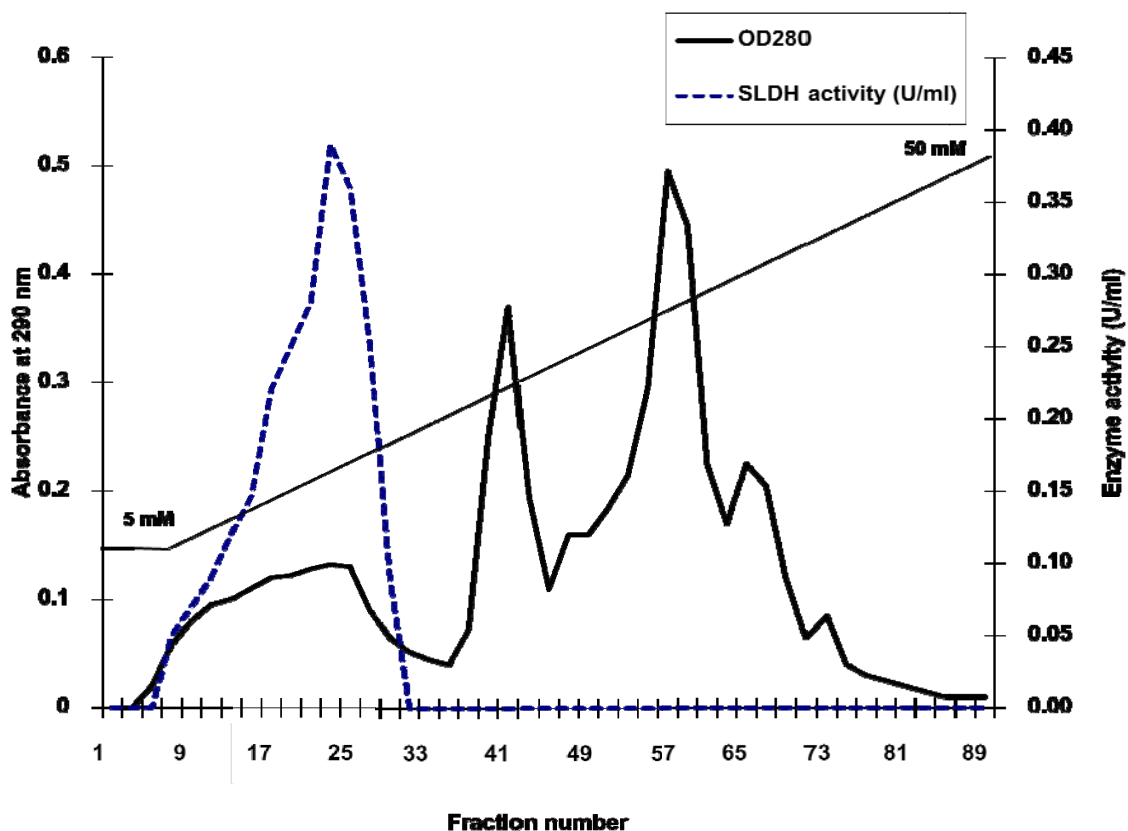
4.3 การละลายเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสจากเมมเบรนของ *G. frateurii* KMUTT26

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสพบว่าอยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติก ดังนั้นในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จึงต้องมีการละลายเอนไซม์ออกจากเยื่อหุ้มเมมเบรนด้วยสารละลายดีเทอร์เจนท์ ในการทดลองใช้ดีเทอร์เจนท์ประเภท nonionic มีชื่อทางการค้า Mydol 10 โดยใช้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเติม 0.1 M potassium chloride ในสารละลายเมมเบรนที่ปรับให้มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการละลายจะกวนเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของเมมเบรนและส่วนของเอนไซม์ที่ละลายออกมาโดยใช้ความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสในส่วนที่ละลายออกมาเท่ากับ 2.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งเอนไซม์สามารถละลายออกมาคิดเป็นกิจกรรมประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมเอนไซม์ในส่วนของเมมเบรนเพียงประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น หลังจากการละลายเอนไซม์ออกจากเมมเบรนแล้วการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วย potassium ferricyanide ให้ผลกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าการใช้ phenazine methosulfate (PMS)-2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) ดังนั้นในการทดลองหลังจากการละลายเอนไซม์จึงใช้ PMS-DCIP เป็นตัววัดอิเล็กตรอนของปฏิกิริยาออกซิเดชัน

4.4 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจาก *G. frateurii* KMUTT26

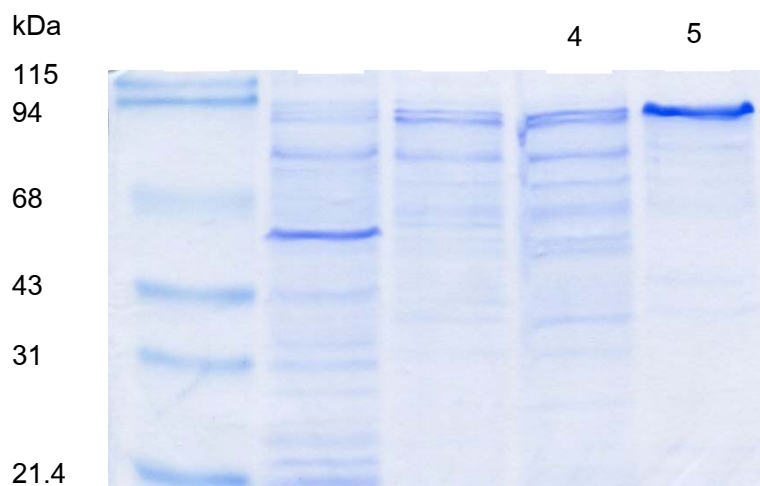
นำเอนไซม์ที่ได้จากการละลายด้วยดีเทอร์เจนมาในบัฟเฟอร์ 5 mM sodium acetate พีเอช 5.0 ที่ประกอบด้วย Mydol 10 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 mM CaCl_2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาผ่าน DEAE-Toyopearl column chromatography (ขนาด 3x15 ซม.) ที่ปรับสภาพด้วยบัฟเฟอร์ 5 mM sodium acetate พีเอช 5.0 ที่ประกอบด้วย Mydol 10 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 mM CaCl_2 ทำการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสในส่วนของการหลุดช่วงแรก แสดงถึงเอนไซม์ไม่เกาะกับเรซินที่ใช้ หลังจากเก็บรวบรวมหลอดที่มีกิจกรรมเอนไซม์และนำมาไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ 5 mM sodium acetate พีเอช 4.5 ที่ประกอบด้วย Mydol 10 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์, 20 mM D-sorbitol และ 5 mM CaCl_2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้มาผ่าน CM-Toyopearl column chromatography ซึ่งได้ปรับสภาพด้วยบัฟเฟอร์ 5 mM sodium acetate พีเอช 4.5 ที่ประกอบด้วย Mydol 10 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์, 20 mM D-sorbitol และ 5 mM CaCl_2 ทำการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน และทำการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วยวิธี linear gradient ของบัฟเฟอร์เดิมที่มีเกลือ CaCl_2 ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 5 mM – 50 mM โดยใช้อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงที่ใช้เกลือ CaCl_2 ที่ประมาณความเข้มข้น 10-15 mM (รูปที่ 8) ทำการเก็บหลอดที่มีกิจกรรมเอนไซม์รวมกันใส่ในถุงไดอะไลซิสแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการใช้น้ำตาลซูโครสปิดทับบนถุงไดอะไลซิส เก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตารางที่ 7 เป็นตารางการสรุปการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจากเยื่อหุ้มเมมเบรนของ *G. frateurii* KMUTT26 เอนไซม์เมื่ออยู่ในเยื่อหุ้มเมมเบรนมีกิจกรรมจำเพาะ 1.29 ยูนิตต่อมิลลิกรัม หลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสมีค่ากิจกรรมจำเพาะ 6.37 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อใช้ซอพิทอลเป็นสับสเตรท ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะที่ได้มีค่ามากกว่าในเมมเบรนประมาณ 5 เท่า เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์ให้แถบโปรตีนขนาด 80 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE



รูปที่ 8 โครมาโทกราฟีของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจาก *Gluconobacter frateurii* KMUTT26 จากคอลัมน์ CM-Toyopearl

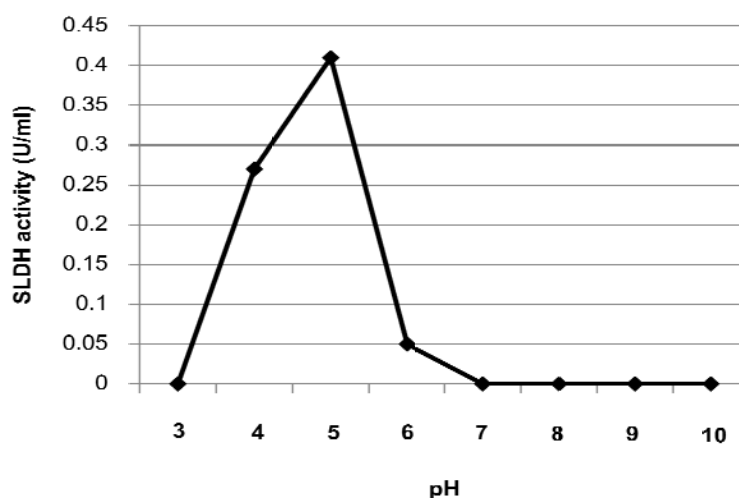
ตารางที่ 7 สรุปการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสจากเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อน *Gluconobacter frateurii* KMUTT 26

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Membrane fraction	60	8.36	10.79	502	647	1.29	1.0
Solubilization	63.5	2	4.96	127	315	2.48	1.92
DEAE-Toyopearl	98	0.34	1.53	33.3	150	4.50	3.49
CM-Toyopearl	89	0.064	0.41	5.73	36.5	6.37	4.94



รูปที่ 9 SDS-PAGE ของเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสที่แยกบริสุทธิ์ได้จากเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อน *Gluconobacter frateurii* KMUTT 26
 เลนที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน, เลนที่ 2 cell-free extract, เลนที่ 3 solubilized enzyme, เลนที่ 4 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl, เลนที่ 5 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ CM-Toyopearl

คุณลักษณะของเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 5.0 ดังแสดงในรูปที่ 10 เช่นเดียวกับค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่พบในเมมเบรน การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทพบว่าเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสสามารถออกซิไดซ์น้ำตาลแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด คือ ซอบีทอล แมนนิทอล ดี-อะราบิทอล เมโซ-อิริทริทอลและกลีเซอรอล แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์ แอล-อะราบิทอล ดีแอล-ทรีทอล ไมโอ-อินซิทอล โซลิทอล ดูซิทอล เอธานอล เมธานอล อะเซตาลดีไฮด์ และฟีนอลอัลดีไฮด์ได้ เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่าคงที่ Michaelis เมื่อใช้ซอบีทอลเป็นสับสเตรทเท่ากับ 40 mM ไม่สามารถใช้ potassium ferricyanide เป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ชี้ให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ที่ไม่มี heme

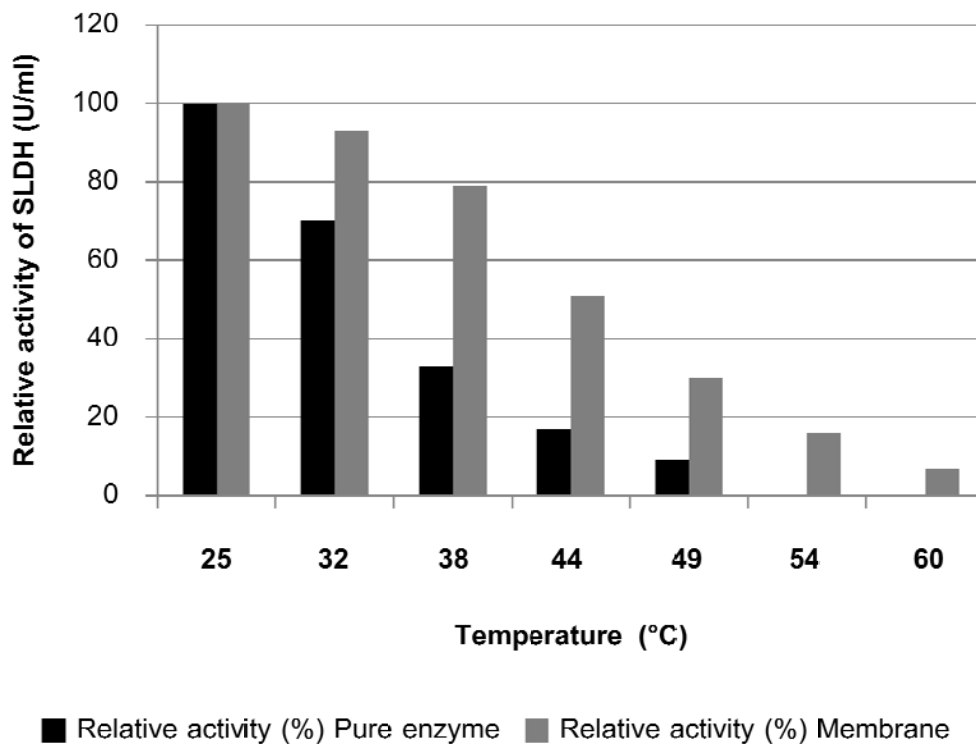


รูปที่ 10 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์

ตารางที่ 8 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์ที่แยกจากเมมเบรนของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อน *Gluconobacter frateurii* KMUTT 26

สับสเตรท	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)
D-sorbitol	0.41
D-mannitol	0.26
D-arabitol	0.77
L-arabitol	0
DL-threitol	0
meso-erythritol	0.54
Myo-inositol	0
glycerol	0.42
xylitol	0
ducitol	0

การตรวจสอบความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรนกับเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ตั้งแต่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์ทั้งที่อยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรนและเอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากันที่ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีกิจกรรมสัมพันธ์ลดลงอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมเอนไซม์ลดลง 2 ใน 3 ส่วนของกิจกรรมเอนไซม์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ที่ไม่ได้แยกบริสุทธิ์หรืออยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรนมีความเสถียรมากกว่า และมีกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลง และที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์จากที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ความเสถียรของเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสต่ออุณหภูมิ

5. ผลการผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเจลและการผลิตน้ำตาลซอโบส

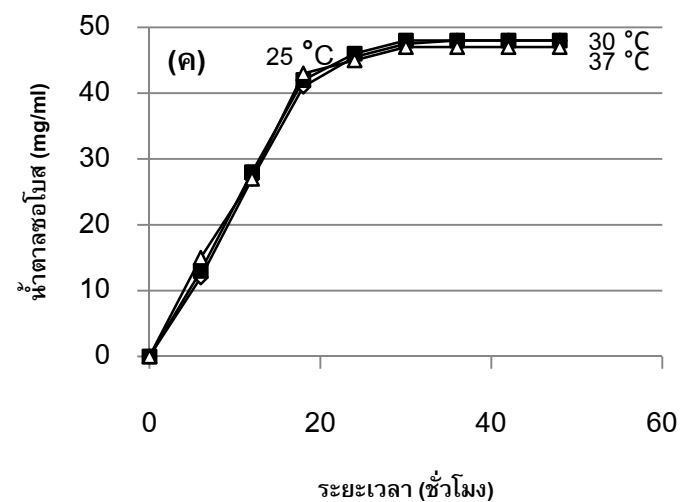
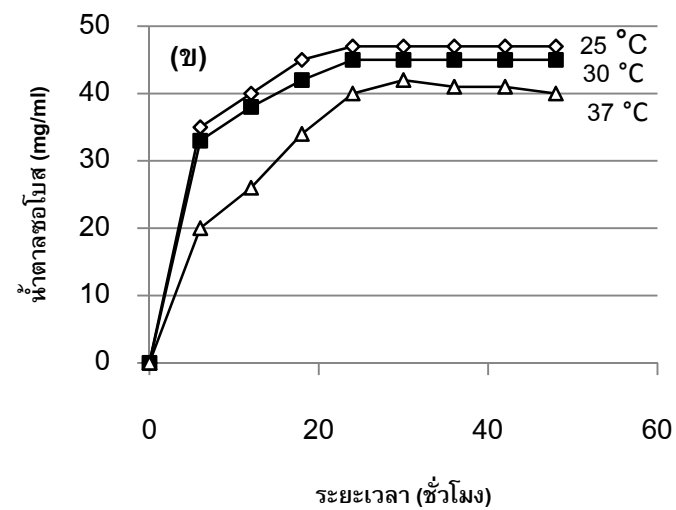
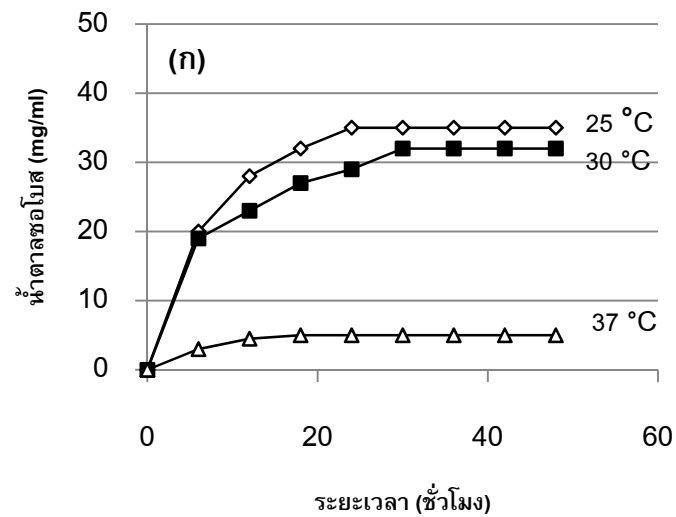
การทดสอบการผลิตน้ำตาลซอโบสใช้สับسترน้ำตาลซอพิทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยใช้วิธีการตรึงเอนไซม์บริสุทธิ์ การตรึงเอนไซม์โดยใช้ส่วนของเยื่อหุ้มเมมเบรน และการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกทอนรอน *Gluconobacter frateurii* KMUTT26 ในแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าผลการผลิตน้ำตาลซอโบสจากการตรึงเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสูงที่สุดโดยสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูงที่สุด 35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้ต่ำกว่าเล็กน้อยโดยมีผลผลิตที่ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิสูงถึง 37 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลซอโบสลดลงอย่างมากเหลือผลผลิตเพียง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ที่อุณหภูมิสูงทำให้กิจกรรมเอนไซม์บริสุทธิ์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองความเสถียรของเอนไซม์ในข้อ 4 (รูปที่ 12ก) เมื่อพิจารณาผลการผลิตน้ำตาลซอโบสจากการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนโดยไม่ต้องผ่านการแยกบริสุทธิ์ พบว่าให้ผลผลิตน้ำตาลซอโบสสูงกว่าการใช้วิธีการตรึงเอนไซม์บริสุทธิ์ในทุกๆ อุณหภูมิที่ใช้ผลิต อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสให้ผลผลิตสูงที่สุด 47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ผลผลิตที่ 45 และ 43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 30 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 12ข) สำหรับการผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเซลล์พบว่าทั้งที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียสให้ผลผลิตน้ำตาลซอโบสไม่แตกต่างกัน โดยมี

ปริมาณการผลิตน้ำตาลซูโครสสูงสุดที่ 47-48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 30-36 และปริมาณน้ำตาลซูโครสยังคงสะสมอยู่ในสารละลายอย่างคงที่ตลอดช่วงของระยะเวลาการผลิต (รูปที่ 12ค) จากการทดลองพบว่าการใช้วิธีการตรึงเอนไซม์บริสุทธิ์ผลิตน้ำตาลซูโครสให้ผลผลิตน้อยกว่าวิธีการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนโดยตรงและวิธีการตรึงเซลล์ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใช้เฉพาะวิธีการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนและวิธีการตรึงเซลล์

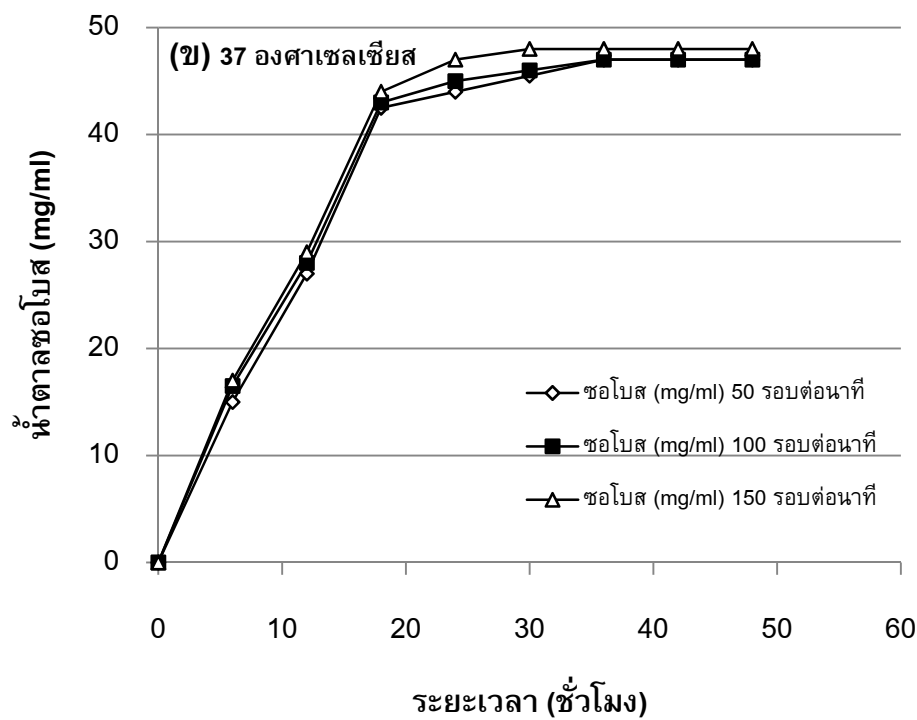
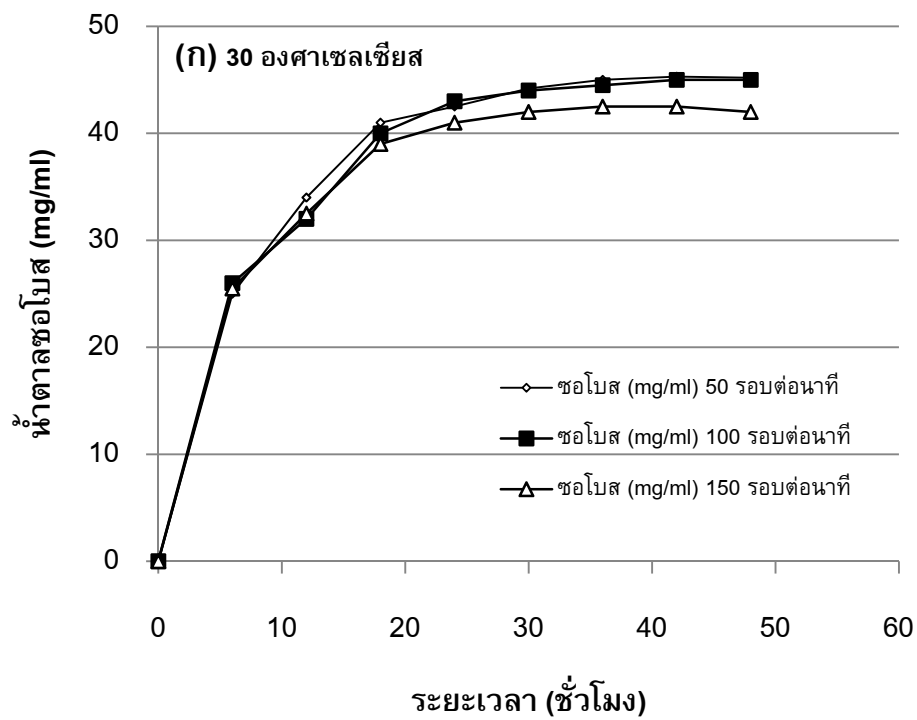
5.2 ผลของอัตราการกวนให้อากาศต่อการผลิตน้ำตาลซูโครส

จากการนำเยื่อหุ้มเมมเบรนและเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติก *Gluconobacter frateurii* KMUTT26 มาตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้สับสเตรมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในกรณีของการตรึงเยื่อหุ้มเมมเบรนและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในกรณีของการตรึงเซลล์ ในการทดลองทำการผันแปรอัตราการกวนให้อากาศที่ความเร็ว 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที ผลการผลิตน้ำตาลซูโครสจากวิธีการตรึงเยื่อหุ้มเมมเบรนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเร็ว 50 และ 100 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตใกล้เคียงกัน คือ สามารถผลิตน้ำตาลซูโครสได้ 43-45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 30 ชั่วโมง ในขณะที่การให้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลง โดยสามารถผลิตน้ำตาลซูโครสได้ 41-42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วในการเขย่ามากเกินไปมีผลทำให้เม็ดอัลจิเนตเกิดการเสียดสีและเอนไซม์ที่ถูกตรึงหลุดออกมาบางส่วนและส่งผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าในช่วงท้ายของการผลิตปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 13ก)

การผลิตน้ำตาลซูโครสด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *G. frateurii* KMUTT26 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลซูโครสได้สูงในทุกอัตราการกวนให้อากาศ โดยอัตราการกวนให้อากาศที่ 50 และ 100 รอบต่อนาทีสามารถผลิตน้ำตาลซูโครสได้สูงสุด 46-47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง สำหรับความเร็วรอบในการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตน้ำตาลซูโครสสูงกว่าเล็กน้อยคือ 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการใช้อัตราการกวนให้อากาศ 150 รอบต่อนาทีทำให้เม็ดอัลจิเนตเกิดการเสียดสีและเซลล์ที่ถูกตรึงหลุดออกมาทำให้เกิดสารละลายขุ่น และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ผลิตได้สูงขึ้นกว่าการใช้ความเร็วรอบที่ 50 และ 100 รอบต่อนาทีอาจเป็นผลจากเซลล์ที่หลุดออกมาในสารละลายซูโครสซึ่งสามารถออกซิไดซ์ได้น้ำตาลซูโครสได้เร็วกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต (รูปที่ 13ข) ดังนั้นในการทดลองดังกล่าวนี้อัตราการกวนให้อากาศที่เหมาะสมคือ 100 รอบต่อนาที ทั้งในส่วนการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์



รูปที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์
 (ก) เอนไซม์ซอบีทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์ (ข) เยื่อหุ้มเมมเบรน (ค) เซลล์แบคทีเรียอะซิติกทอนร้อน



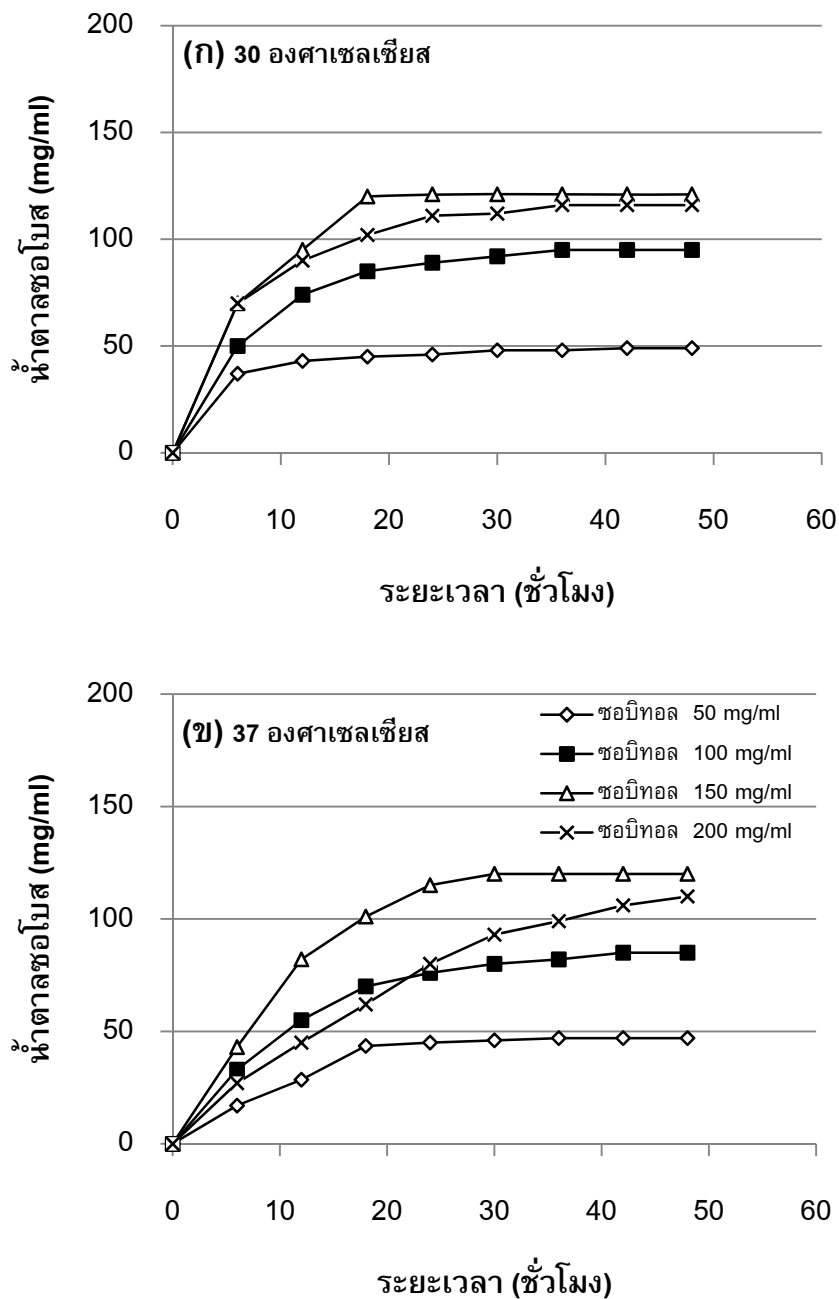
รูปที่ 13 ผลของอัตราการกวนให้อากาศต่อการผลิตน้ำตาลชอโบสด้วย (ก) วิธีการตรึงเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรนและ (ข) วิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติก *Gluconobacter frateurii* KMUTT26

5.3 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรพน้ำตาลซอพิทอลต่อการผลิตน้ำตาลซอโบส

จากการใช้น้ำตาลซอพิทอลเป็นสับสเตรพทั้งหมด 4 ความเข้มข้นสำหรับการผลิตน้ำตาลซอโบส ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยทำการทดลองผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเยื่อหุ้มเมมเบรน ซึ่งปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติก *G. frateurii* KMUTT26 ที่ปมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการกวนให้อากาศที่ 100 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่าการผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเยื่อหุ้มเมมเบรนของ *G. frateurii* KMUTT26 ให้ผลผลิตน้ำตาลซอโบสเร็วกว่าวิธีการตรึงเซลล์ ในช่วงเวลาที่ 0-12 ปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ผลิตได้จากสับสเตรพทั้ง 4 ความเข้มข้นมีค่าใกล้เคียงกัน หลังจากช่วงเวลาที่ 12 ปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ผลิตได้มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอล 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูง 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือน้ำตาลซอพิทอลถูกออกซิไดซ์เป็นน้ำตาลซอโบส 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 18 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลซอพิทอลความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ที่อยู่ในเมมเบรนสามารถออกซิไดซ์ซอพิทอลไปเป็นน้ำตาลซอโบสได้ 89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 89 เปอร์เซ็นต์ ที่น้ำตาลซอโบสผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลซอโบสเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และสูงสุดที่ 95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือน้ำตาลซอพิทอลถูกออกซิไดซ์เป็นน้ำตาลซอโบส 95 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลสูงขึ้นเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสที่อยู่ในเมมเบรนสามารถออกซิไดซ์ได้น้ำตาลซอโบสสูงที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยมีปริมาณน้ำตาลซอโบส 121 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 80.66 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำตาลซอโบสคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการผลิตที่ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 14ก) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้น้ำตาลซอพิทอลสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์พบว่าปริมาณน้ำตาลซอโบสในช่วง 12 ชั่วโมงแรกมีปริมาณใกล้เคียงกับเมื่อใช้ซอพิทอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากการผลิตที่ 12 ชั่วโมงปริมาณน้ำตาลซอโบสกลับมีปริมาณการผลิตที่ต่ำกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของซอพิทอลที่ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิตที่ได้สูงที่สุด 111-116 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเพียง 55.5-58 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ที่เวลา 24-36 ชั่วโมง จากการทดลองการตรึงเอนไซม์ซอพิทอลดีไฮโดรจีเนสในรูปของเยื่อหุ้มเมมเบรนสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถใช้น้ำตาลซอพิทอลเป็นสับสเตรพได้สูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ และสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้ 80.66 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

การผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *G. frateurii* KMUTT26 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอล 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูงสุด 46-47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแนวโน้มคงที่ ตั้งแต่เวลา 18 ชั่วโมง หรือคิดเป็นผลผลิต 93 เปอร์เซ็นต์ จากการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณผลผลิตน้ำตาลซอโบสที่ได้เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เวลา 30 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ *G. frateurii* KMUTT26 ในรูปของการตรึงเซลล์สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูงสุดที่ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง หรือคิดเป็นปริมาณผลผลิต 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลสูงขึ้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ การผลิตน้ำตาลซอโบสให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับการผลิตโดยวิธีการตรึงเอนไซม์กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซอพิทอลที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณของผลผลิตน้ำตาลซอโบสน้อยลง โดยสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสสูงสุดเพียง 110 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่

เวลา 48 ชั่วโมง หรือคิดเป็นปริมาณผลผลิตน้ำตาลซอโบส 55 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 14ข) จากการทดลองการตรึงเซลล์ *G. frateurii* KMUTT26 สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้สูงเช่นเดียวกับการผลิตด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์ แต่ระยะเวลาในการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำตาลซอโบสสูงต้องใช้เวลานานกว่าวิธีการผลิตด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์ 6-12 ชั่วโมง



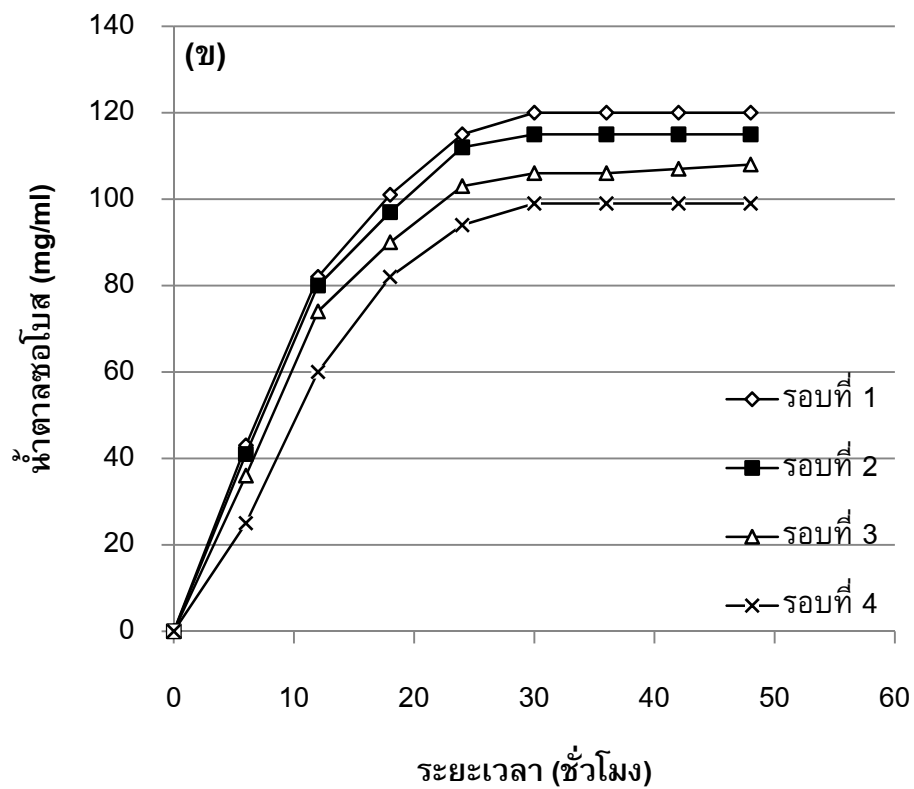
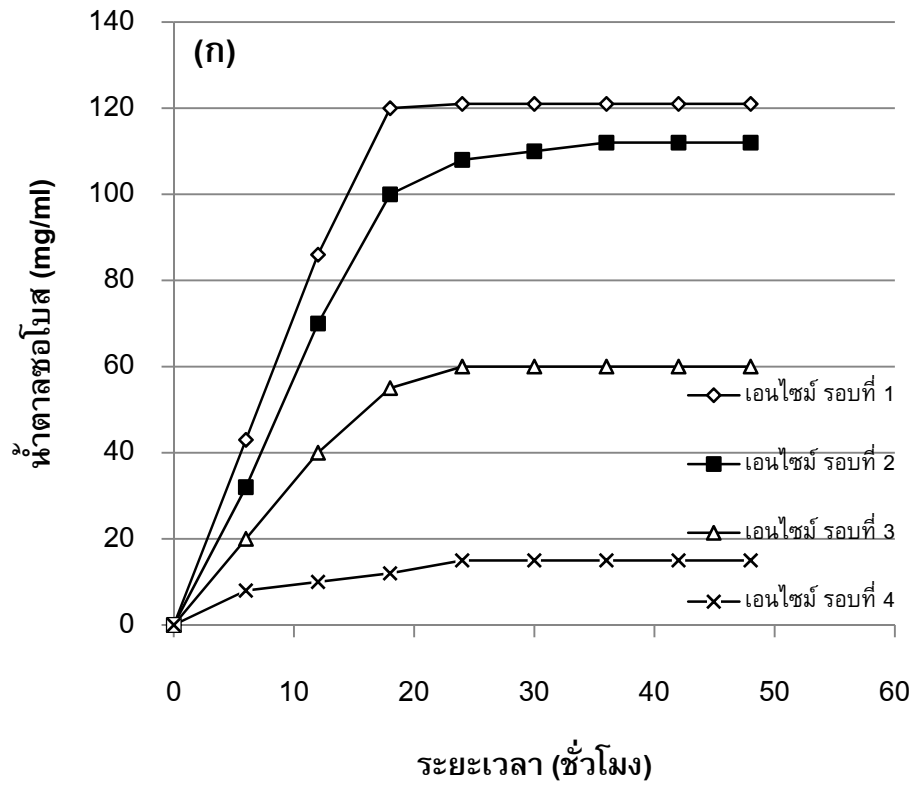
รูปที่ 14 การผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรน (ก) และวิธีการตรึงเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อน *Gluconobacter frateurii* KMUTT26 (ข) เมื่อใช้น้ำตาลซอโบสความเข้มข้นต่างๆ เป็นสับสเตรท

5.4 ผลของการนำเม็ดอัลจินเตกลับมาใช้ใหม่สำหรับการผลิตน้ำตาลซอโบส

การผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนและเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติก *Gluconobacter frateurii* KMUTT26 ในอัลจินเตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สับสเตอร์น้ำตาลซอโบส ทอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ให้อากาศที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยทดลองนำเม็ดอัลจินเตกลับมาใช้ใหม่จำนวน 4 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าการใช้เม็ดอัลจินเตที่ตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนให้ผลการผลิตครั้งแรกดีที่สุด โดยให้ผลผลิตน้ำตาลซอโบส สูงที่สุดเวลา 18 ชั่วโมง และคงที่ตลอดระยะเวลาการผลิต ซึ่งให้ผลผลิตที่ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเม็ดอัลจินเตมาใช้ในการผลิตรอบที่สองพบว่าปริมาณน้ำตาลซอโบสลดลง ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการผลิตในรอบแรก แต่เมื่อนำกลับมาใช้ผลิตน้ำตาลซอโบสใหม่ในครั้งที่ 3 ปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ผลิตได้ลดปริมาณลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือได้ปริมาณผลผลิตเพียง 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำเม็ดอัลจินเตที่ตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนกลับมาใช้ผลิตน้ำตาลซอโบสใหม่เป็นครั้งที่ 4 ปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ผลิตได้เหลือเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตครั้งที่ 1 ทั้งนี้เป็นผลมาจากกิจกรรมเอนไซม์ซอโบสไฮโดรจีเนสที่ตรึงในเม็ดอัลจินเตมีกิจกรรมลดลงเมื่อระยะเวลาการผลิตเพิ่มขึ้น (รูปที่ 15ก)

จากการใช้เม็ดอัลจินเตที่ตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกทนร้อนสำหรับผลิตน้ำตาลซอโบสในครั้งที่ 1 พบว่าปริมาณการผลิตน้ำตาลซอโบสให้ผลผลิตช้ากว่าวิธีการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนประมาณ 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามผลผลิตปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ผลิตด้วยวิธีการตรึงเซลล์สูงถึง 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการผลิตครั้งแรกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้นำเม็ดอัลจินเตกลับมาใช้ผลิตโดยใส่ลงไปในการละลายซอโบสใหม่ ผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลซอโบสที่ได้มีปริมาณลดลงจากครั้งแรกเล็กน้อย เมื่อนำกลับมาใช้ผลิตน้ำตาลซอโบสใหม่เป็นครั้งที่ 3 พบว่าได้ปริมาณผลผลิตน้ำตาลซอโบสที่ 105 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงจากการผลิตครั้งแรก 12.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำกลับมาผลิตเป็นครั้งที่ 4 พบว่าปริมาณการผลิตน้ำตาลซอโบสได้เท่ากับ 99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 82.5 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตครั้งแรก ทั้งนี้ลดลง 17.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 15ข)

การเปรียบเทียบผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์ด้วยอัลจินเต พบว่าการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกทนร้อนให้ผลการผลิตได้ดีกว่าการตรึงเอนไซม์ ทั้งนี้การตรึงเซลล์สามารถนำกลับมาใช้ในการผลิตน้ำตาลซอโบสได้ใหม่ถึง 4 ครั้ง ในขณะที่การตรึงเอนไซม์สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้เพียง 2 ครั้ง



รูปที่ 15 ผลของการนำเม็ดอัลจินตที่ได้จากการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์กลับมาใช้ผลิตน้ำตาลซูโครส (ก) เอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเมมเบรน (ข) เซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกทอนร็อน *Gluconobacter frateurii* KMUTT26

บทวิจารณ์

น้ำตาลซอโบสเป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญทางเทคโนโลยีชีวภาพและเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นสารตัวกลางที่ใช้ในการผลิตวิตามินซีโดยวิธีการสังเคราะห์ของ Reichstein-Grussner (Prescott and Dunn, 1959; Asai, 1968) วิธีการสังเคราะห์วิตามินซีของ Reichstein-Grussner ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ซึ่งเป็นขั้นตอนทางเคมี 4 ขั้นตอน และวิธีการทางชีวภาพ 1 ขั้นตอน โดยขั้นตอนทางชีวภาพเป็นขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลซอบิทอลไปเป็นน้ำตาลซอโบสด้วยแบคทีเรียอะซิติก ในการผลิตน้ำตาลซอโบสสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ surface growth และ submerged growth ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25-30 องศาเซลเซียส (Asai, 1968) หรือต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส (Yang et al., 1997) ในการวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนจากแหล่งธรรมชาติเพื่อการพัฒนาการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูงโดยวิธีการตรึงเซลล์หรือการตรึงเอนไซม์ การตรึงเซลล์หรือการตรึงเอนไซม์มีข้อดีคือสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้สำหรับการผลิตใหม่ได้ ซึ่งเป็นการลดการสูญเสียด้านค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงเชื้อและการผลิตที่ใช้ระยะเวลาน้อยลง ประกอบกับการใช้เซลล์แบคทีเรียอะซิติกทนร้อนผลิตจะช่วยลดพลังงานที่ใช้ในการผลิตได้อีกทางหนึ่ง (Saeki et al., 1997; Moonmangmee et al., 2000) จากการการแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกจากแหล่งต่างๆ พบแบคทีเรียอะซิติกที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียอะซิติกส่วนใหญ่ที่แยกได้สามารถผลิตน้ำตาลซอโบสเนื่องจากใช้น้ำตาลซอบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะ อย่างไรก็ตามในการแยกแบคทีเรียอะซิติกนี้ยังพบแบคทีเรียอะซิติกส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถออกซิไดซ์น้ำตาลซอบิทอลไปเป็นน้ำตาลซอโบสได้ ทั้งนี้เนื่องจากในสูตรอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อประกอบด้วยเอทานอล โดยปกติการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการคัดเลือกและเป็นการเพิ่มประชากรแบคทีเรียกลุ่มอะซิติกจากกลุ่มประชากรของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งแบคทีเรียอะซิติกส่วนใหญ่ในกลุ่ม *Acetobacter* sp. และ *Gluconacetobacter* sp. สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้โดยไม่ต้องใช้น้ำตาลซอบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน (Lisdiyanti et al., 2001; Tanasupawat et al., 2004) โดยทั่วไปแบคทีเรียอะซิติกที่นำมาใช้สำหรับการผลิตน้ำตาลซอโบสในระดับอุตสาหกรรมสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นจึงสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้ที่อุณหภูมิสูงดังกล่าวได้ดีเช่นเดียวกัน (Moonmangmee et al., 2000) จากการจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนทั้งหมดที่แยกได้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter xylinus* และ *Gluconobacter frateurii* โดยใช้พื้นฐานการจัดจำแนกด้วยลักษณะพื้นฐานทางสัณฐาน ปฏิบัติทางชีวเคมี และวิธีการหาลำดับเบสของ 16S-25S rDNA intergenic spacer ทั้งนี้การจำแนกได้เพียง 3 กลุ่ม เนื่องมาจากการวิจัยใช้กลุ่มตัวอย่างผลไม้จำนวนไม่หลากหลาย จากการรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกในประเทศไทยของ Seearunruangchai et al. (2004) ใช้ตัวอย่างผลไม้หลากหลายมากกว่า 25 ชนิด ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-ethanol พบแบคทีเรียอะซิติกหลายชนิดได้แก่ *A. orientalis*, *A. pasteurianus* และ *Ga. liquefaciens* การใช้เทคนิคการจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกด้วยบริเวณ 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region เป็นวิธีการจัดจำแนกได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพและสามารถระบุความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน (Trcek, 2005)

การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติก *G. frateurii* KMUTT26 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นโปรตีนที่มีเพียงหนึ่งหน่วยย่อยขนาด 80 kDa และใช้ PMS-DCIP เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ไม่มี flavin เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้นี้สามารถออกซิไดซ์น้ำตาลแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด เช่น arabitol, sorbitol, mannitol และ glycerol และมีน้ำตาลซอโบสเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยมีซอร์บิทอลเป็นสับสเตรท (Moonmangmee et al., 2000; White and Claus, 1982) ซึ่งเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์จากรายงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสที่ Shinagawa et al. (1982) ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์จากเยื่อหุ้มเมมเบรนของ *Gluconobacter suboxydans* var. α โดยเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์นี้ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่หน่วยย่อยที่หนึ่งเรียกว่า flavoprotein มีขนาด 63 kDa (มี flavin adenine dinucleotide เป็น prosthetic group ของเอนไซม์) หน่วยย่อยที่สองเรียกว่า cytochrom c มีขนาด 51 kDa และหน่วยย่อยที่สามมีขนาด 17 kDa เอนไซม์บริสุทธิ์มีความจำเพาะสูงต่อซอร์บิทอลที่ใช้เป็นสับสเตรท อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดังกล่าวสามารถออกซิไดซ์แมนนิทอลได้ในอัตรา 5 % ของซอร์บิทอล นอกจากนี้ Cho et al. (1990) ได้แยกบริสุทธิ์เอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสจากเยื่อหุ้มเซลล์ของ *G. melanogenus* แต่ไม่มี flavin เป็นองค์ประกอบ หลังจากนั้น Choi et al. (1995) ได้แยกเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์จากเยื่อหุ้มเซลล์ของ *G. suboxydans* KCTC 2111 (=ATCC 621) พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยที่มีขนาด 75, 50 และ 14 kDa และมี PQQ เป็นโคเอนไซม์ในหน่วยย่อยที่หนึ่ง ในขณะที่หน่วยย่อยที่สองเป็น cytochrom c เอนไซม์บริสุทธิ์มีความจำเพาะกับสับสเตรทหลากหลายชนิด โดยสามารถออกซิไดซ์ซอร์บิทอลสูงสุด (100%) รองลงมาคือแมนนิทอล (68%) และรีบิทอล (70%) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสที่แยกบริสุทธิ์ได้จากการทดลองนี้อาจมีส่วนคล้ายกับเอนไซม์จากการรายงานของ Adachi et al. (2001) ซึ่งได้รายงานการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ D-arabitol dehydrogenase (ARDH) จากเยื่อหุ้มเซลล์ของ *G. suboxydans* IFO 3257 กล่าวคือ เอนไซม์ ARDH มี 2 หน่วยย่อย คือขนาด 82 และ 14 kDa และมี PQQ เป็น prosthetic group และสามารถออกซิไดซ์น้ำตาลแอลกอฮอล์ได้หลายชนิดเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะ arabitol, sorbitol, mannitol, meso-erythritol และ glycerol เมื่อไม่นานมานี้ Wichai et al. (2008) ได้ค้นพบว่าแบคทีเรียอะซิติก *Gluconobacter frateurii* THD32 มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันของน้ำตาลซอร์บิทอลสองชนิดภายในสายพันธุ์เดียวกัน และเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ ชนิดแรกคือ pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol dehydrogenase (PQQ-GLDH) ทำหน้าที่สร้างพลังงานและผลิตน้ำตาลซอโบสเป็นหลักในช่วงแรกๆ ของการเจริญ และสำหรับ FAD-dependent D-sorbitol dehydrogenase (FAD-SLDH) จะทำงานระยะกลางถึงระยะท้ายของการเจริญโดยเอนไซม์ FAD-SLDH จะถูกกระตุ้นเมื่อมีปริมาณน้ำตาลซอร์บิทอลหรือน้ำตาลซอโบสสูงและจะออกซิไดซ์น้ำตาลซอร์บิทอลไปเป็นน้ำตาลซอโบสเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback regulation)

การผลิตน้ำตาลซอโบสในระดับอุตสาหกรรมมักใช้วิธีการผลิตด้วยการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาดใหญ่และมีการแยกให้ได้ผลผลิตที่บริสุทธิ์ แต่ด้วยขั้นตอนวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน การผลิตด้วยวิธีการตรึงเซลล์และการตรึงเอนไซม์ในวัสดุต่างๆ จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ทั้งนี้การตรึงเซลล์และการตรึงเอนไซม์ในวัสดุมีข้อดีหลายประการได้แก่ (1) เซลล์หรือเอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่

ได้ (2) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาสามารถแยกออกจากเอนไซม์ได้ง่าย และ (3) กิจกรรมของเซลล์และเอนไซม์ยังคงมีเสถียรภาพเป็นระยะเวลานาน ในการตรึงเอนไซม์สำหรับการผลิต 3-dehydroshikimate จะใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นวัสดุตรึงเนื่องจากมีราคาถูกและเป็นวัสดุที่ไม่ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง (Adachi et al., 2010) เอนไซม์ชนิดอื่นๆที่ใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้ถูกนำมาตรึงในวัสดุชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส นำมาตรึงในวัสดุชนิด glass beads, polymeric microspheres, cellulose beads, หรือ reactive membranes หรือ fibers หรือ polyester beads (Rasiah and Rehm, 2009) เอนไซม์ไลเปสทนร้อน จากแบคทีเรีย *Pyrococcus furiosus* นำมาตรึงในวัสดุประเภท butyl sepabeads และ octadecyl sepabeads (Branco et al., 2010) เอนไซม์ β -galactosidase ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถใช้ได้ทั้งในรูปของ soluble หรือในรูปของเอนไซม์ที่ถูกตรึงได้ 3 แบบ คือ (1) physical adsorption ตรึงด้วยวัสดุประเภท chitosan, phenol-formaldehyde resin (2) entrapment ตรึงด้วยวัสดุประเภท agarose bead, polyacrylamide, calcium alginate (3) covalent binding ตรึงด้วยวัสดุประเภท gelatin, polyvinyl alcohol, hen egg white, silica-alumina เป็นต้น (Panesar et al., 2010) การตรึงเอนไซม์ในวัสดุดังกล่าวส่งผลทำให้ได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์และเอนไซม์มีความเสถียรในวัสดุตรึงนั้นๆ ได้เป็นระยะเวลานาน

ในการตรึงเซลล์และเอนไซม์ซอบิโกลดีไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิสูง 37 องศาเซลเซียส ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยที่นำเสนอจึงเป็นงานวิจัยนำร่องในการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูงโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นวัสดุตรึง ในอดีตการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกสำหรับใช้ผลิตน้ำตาลซอโบสจากน้ำตาลซอบิโกลหรือซอโบโซนจากน้ำตาลซอโบสใช้วิธี entrapment growing cells ด้วย calcium alginate (Fukui and Tanaka, 1982) polyacrylamide gel (Martin and Perlman, 1976; Pomortseva and Krasilnikova, 1983) sintered glass (Spasov et al., 1995) จากผลการทดลองการทดสอบความทนของเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า เอนไซม์ซอบิโกลดีไฮโดรจีเนสที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *G. frateurii* KMUTT26 สามารถทนต่อความร้อนและยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่เกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับ Saeki et al. (1997) ที่ได้ทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสหลังจากการบ่มเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกสกุล *Acetobacter pasteurianus* SKU108 พบว่าเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมสูงหลังจากบ่มเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิสูง ในงานวิจัยนี้ได้นำเอนไซม์ซอบิโกลดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกมาตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตและนำไปผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าผลผลิตน้ำตาลซอโบสที่ได้จากการตรึงเอนไซม์บริสุทธิ์ต่ำกว่าในส่วนของการผลิตที่ใช้วิธีการตรึงเยื่อหุ้มเมเบรนและการตรึงเซลล์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเอนไซม์บริสุทธิ์ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน และเป็นเอนไซม์ที่ไม่ได้อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ จึงสูญเสียความเป็น hydrophobic การทดลองจึงไม่ได้นำเอนไซม์บริสุทธิ์มาใช้ในการผลิตน้ำตาลซอโบส เนื่องจากคำนึงถึงขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ที่ใช้เวลานาน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ประกอบความไม่มีเสถียรภาพของเอนไซม์บริสุทธิ์เมื่อต้องบ่มที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นในการทดลองจึงใช้เฉพาะเอนไซม์ที่ยังไม่ได้แยกบริสุทธิ์และเซลล์ (รูปที่ 12) การตรึงเอนไซม์หรือการตรึงเซลล์ในวัสดุตรึงจะช่วยให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมลงน้อยลงและทนต่อความร้อนได้ดี (Panesar et al., 2010; Branco et al., 2010) ในการวิจัยนี้พบว่าความเข้มข้นของสับสเตรทสูง 200 กรัมต่อลิตรมีผลต่อการยับยั้งการผลิตน้ำตาลซอโบส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Damodaran

and Subramanian (1951); Bosnjak et al. (1991); Bonomi et al. (1993) และ Wulf et al. (2000) ที่พบว่าความเข้มข้นของซอบิทอลสามารถยับยั้งการผลิตน้ำตาลซอโบสเมื่อความเข้มข้นของซอบิทอลสูงมากกว่า 200 กรัมต่อลิตรในการหมักแบบกะ (batch) การให้อากาศพบว่ามีผลต่อการผลิตน้ำตาลซอโบสทั้งนี้การกวนให้อากาศด้วยความเร็วรอบที่มากกว่าจะทำให้ผลิตน้ำตาลซอโบสได้ดีกว่า เนื่องจากแบคทีเรียอะซิติกเป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ก๊าซออกซิเจนในการหายใจและใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายควบคู่ไปกับการสังเคราะห์พลังงาน ATP ในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Matsushita et al., 1994) จากการรายงานของ Giridhar and Srivastava (2000) ได้ใช้ oxygen vector ชนิด N-hexadecane ความเข้มข้น 1-6% เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตน้ำตาลซอโบสนอกจากการเขย่าให้อากาศแบบปกติ สำหรับการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ในการผลิตน้ำตาลซอโบสใหม่ ในงานวิจัยนี้สามารถนำกลับมาใช้ได้ทั้งหมด 4 ครั้ง ในกรณีการตรึงเซลล์ แต่สำหรับการตรึงเอนไซม์จากเยื่อหุ้มเซลล์พบว่าสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เพียง 2 ครั้งเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเมื่ออยู่ในสารละลายและอุณหภูมิสูงต่อเนื่องเป็นเวลานาน งานวิจัยการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ใหม่นี้สอดคล้องกับการรายงานของ Pomortseva and Krasilnikova (1983) พบว่าการผลิตน้ำตาลซอโบสด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *G. oxydans* สายพันธุ์ No.6 VNIVI ใน polyacrylamide gel สามารถนำกลับมาใช้ได้ถึง 5 ครั้ง ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลซอโบสได้ 3.3 g sorbose/L/hr

จากผลงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยนำร่องในการผลิตน้ำตาลซอโบสที่อุณหภูมิสูงด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในยุคปัจจุบันที่อุณหภูมิของโลกร้อนขึ้นทุกปี วิธีนี้จึงเป็นวิธีการที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำตาลซอโบสโดยไม่ต้องใช้ระบบควบคุมอุณหภูมิซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายในด้านพลังงานได้อีกทางหนึ่ง

หนังสืออ้างอิง

- Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Yakushi, T., and Matsushita, K., 2010, Conversion of quinate to 3-dehydroshikimate by ca-alginate-immobilized membrane of *Gluconobacter oxydans* IFO 3244 and subsequent asymmetric reduction of 3-dehydroshikimate to shikimate by immobilized cytoplasmic NADP-shikimate dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 2438-2444.
- Adachi, O., Fujii, Y., Ghaly, M.F., Toyama, H., Shinagawa, E., and Matsushita, K., 2001, Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2755-2762.
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Shinagawa, E., Toyama, H., Yamada, M., and Matsushita, K., 2003, New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochim. Biophysic. Act.* 1647:10-17.
- Asai, T., 1968, Acetic acid bacteria: classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. pp. 125-203.
- Barker, S.A. and Shirley, J.A., 1980, Glucose oxidase, glucose dehydrogenase, glucose isomerase, β -galactosidase and invertase. in "Microbial Enzymes and Bioconversions", ed. Rose, A.H., Academic Press, Ltd., London, pp. 171-226.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B., and Deshpande, V.V., 1996, Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* 60:280-300.
- Bonomi, A., Augusto, E.F.P., Barbosa, N.S., Mattos, M.N., Magossi, L.R., and Santose, A.L., 1993, Unstructured model proposal for the microbial oxidation of D-sorbitol to L-sorbose. *J. Bacteriol.* 31: 39-59.
- Bosnjak, M., Pintar, P., and Gomercic, K., 1991, Gradient fed-batch culture as efficient microbial oxidation method. *Med. Fac Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 56: 1723-1730.
- Branco, R.V., Gutarra, M.L.E., Freire, D.M.G. and Almeida, R.V., 2010, Immobilization and characterization of a recombinant thermostable lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on supports with different degrees of hydrophobicity. *Enzyme Res.* 2010: 1-8.
- Cho, N.-C., Kum, K., and Jhon, D.-Y., 1990, Purification and characterization of polyol dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Korean Biochem. J.* 23:172-178.
- Choi, E.-S., Lee, E.H., and Rhee, S.-K., 1995, Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 125:45-50.
- Damodaran, M. And Subramanian, S.S., 1951, Bacterial oxidation of sorbitol to sorbose. *J. Sci. Ind. Res.* 510: 7-13.

- Darder, M., Casero, E., Pariente, F., and Lorenzo, E., 2000, Biosensors based on membrane-bound enzymes immobilized in a 5-(octyldithio)-2-nitrobenzoic acid layer on gold electrode. *Anal. Chem.* 72:3784-3792.
- De Ley, J., Gillis, M., and Swings, J., 1984, Family Acetobacteraceae. in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. 1, eds. Krieg, N.R. and Holt, J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 267-278.
- Fukui, S. and Tanaka, A., 1982, Immobilized microbial cells. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 145-172.
- Giridhar, R. And Srivastava, A.K., 2000, Productivity enhancement in L-sorbose fermentation using oxygen vector. *Enzyme Microb. Technol.* 27:537-541.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., and Budhiono, A., 2000, Bacterial cellulose-a masterpiece of nature's arts. *J. Material Sci.* 35:261-270.
- Khan, G.F., Kobatake, E., Shinohara, H., Ikariyama, Y., and Aizawa, M., 1992, Molecular interface for an activity controlled enzyme electrode and its application for the determination of fructose. *Anal. Chem.* 64:1254-1258.
- Kinnear, K.T., and Monbouquette, H.G., 1997, An amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase immobilized in a membrane mimetic layer on gold. *Anal. Chem.* 69:1771-1775.
- Leammler, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K., 2000, Systematic Study of the Genus *Acetobacter* with Descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg, 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur, 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr, 1958) comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46:147-165.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K., 2001, Identification of *Acetobacter* Strains Isolated from Indonesian Sources, and Proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47: 119-131.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T., and Komagata, K., 2006, Reclassification of *Gluconobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2101-2111.
- Macauley, S., McNeil, B., and Harvey, L.M., 2001, The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 21:1-25.
- Martin, C.K.A. and Perlman, D., 1976, Conversion of L-sorbose to L-sorbose by immobilized cells of *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Biotechnol. Bioeng.* 18:217-273.

- Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O., 1994, Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. in "Advances in Microbial Physiology", Vol. 36, eds. Rose, A.H. and Tempest, D.W., Academic Press, Ltd., London, pp. 247-301.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. and Matsushita, K., 2000, Isolation and Characterization of Thermotolerant *Gluconobacter* Strains Catalyzing Oxidative Fermentation at Higher Temperatures. Biosci. Biotechnol. Biochem, 64:2306-2315.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. and Matsushita, K., 2002, L-Erythrulose Production by Oxidative Fermentation Is Catalyzed by PQQ-Containing Membrane-Bound Dehydrogenase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 307-318.
- Moonmangmee, D., Fujii, Y., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita, K. and Adachi, O., 2001, Purification and Characterization of Membrane-Bound Quinoprotein Cyclic Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:2763-2772.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O., and Matsushita, K., 2002a, A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. J. Biosci. Bioeng. 93:192-200.
- Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O., Theeragool, G., Lotong, N., and Matsushita, K., 2002b, Purification and characterization of a novel polysaccharide involved in the pellicle produced by thermotolerant *Acetobacter* strain. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:777-783.
- Panesar, P.S., Kumari, S., and Panesar, R., 2010, Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. Enzyme Res. 2010: 1-16.
- Pomortseva, N.V. and Krasilnikova, T.N., 1983, Oxidation of D-sorbitol into L-sorbose by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans*. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal. 17: 721-725.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G., 1959, Industrial Microbiology, 3rd ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, pp. 428-473.
- Rasiah, I.A. and Rehm, B.H.A., 2009, One-step production of immobilized α -amylase in recombinant *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 75: 2012-2016.
- Saeki, A., Theeragool, G., matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi, O., 1997, Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61:138-145.

- Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T., and Yamada, Y., 2004, Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50:47-53.
- Sheu, F., Wang, C.L., and Shyu, Y.T., 2000, Fermentation of *Monascus purpureus* on bacterial cellulose-nata and the color stability of *Monascus*-nata complex. *J. Food Sci.* 65:342-345.
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., and Ameyama, M., 1982, Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. α . *Agric. Biol. Chem.* 46: 135-141.
- Sievers, M. and Swings, J., 2005, Family II. Acetobacteraceae. in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", eds. Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T., 2nd ed., Springer, USA, p. 41.
- Spasov, G., Christov, P., and Pramatarova, V., 1995, Conversion of D-sorbitol to L-sorbose by cells of *Acetobacter suboxydans* immobilized in sintered glass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 35-37.
- Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O., and Yamada, Y., 2004, *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50:159-167.
- Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K., Yamada, Y., and Yoshinaga, F., 1995, The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation culture: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* subsp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41:307-314.
- Trcek, J., 2005, Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 735-745.
- White, S.A. and Claus, G.W., 1982, Effect of intracytoplasmic membrane development on oxidation of sorbitol and other polyols by *Gluconobacter oxydans*. *J. Bacteriol.* 150: 934-943.
- Wichai, S., Adachi, O., Matsushita, K., and Toyama, H., 2008, Distinct physiological roles of two membrane-bound dehydrogenase responsible for D-sorbitol oxidation in *Gluconobacter frateurii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 842-850.
- Wulf, P.D., Soetaert, W., and Wandamme, E.J., 2000, Optimised synthesis of L-sorbose by C₅-dehydrogenation of D-sorbitol with *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 339-343.
- Yang, F.-C. and Lim, Y.-H., 1997, Kinetic study of the bioconversion of D-sorbitol to L-sorbose by *Acetobacter pasteurianus*. *Process Biochem.* 32:233-236.
- Yukphan P, Potacharoen W, Tanasupawat S, Tanticharoen M, and Yamada Y., 2004, *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(Pt 2):313-6.

Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., and Yamada, Y., 2004, *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 50:235-242.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ : ยังไม่ได้ตีพิมพ์
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ยังไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์

ภาคผนวก

ยังไม่ผลงานตีพิมพ์