รหัสโครงการ SUT3-304-60-24-02

รายงานการวิจัย

การผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ AS1600a

(Succinic Acid Production from Rice Straw by Metabolically Engineered *Escherichia coli* AS1600a)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-60-24-02

รายงานการวิจัย

การผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ AS1600a

(Succinic Acid Production from Rice Straw by Metabolically Engineered *Escherichia coli* AS1600a)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันต๊ะมา

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. อภิชัย สาวิสิทธิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้แล้วเสร็จสมบูรณ์ด้วยความเรียบร้อย รวมทั้งขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่ ตลอดถึงความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัย ท้ายที่สุดขอขอบคุณ ดร. อภิชัย สาวิสิทธิ์ เจ้าหน้าที่และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทุกคนที่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องและให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2562

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ AS1600a

อภิชัย สาวิสิทธิ์ และเขมวิทย์ จันต๊ะมา
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

งานนี้แสดงให้เห็นถึงงานบุกเบิกในการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) เพื่อเตรียมการผลิตกรดซักซินิก สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าวอยู่ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วย 2 N H_3PO_4 ด้วยสภาวะเช่นนี้ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 31.2 g/L ที่ได้รับการสกัดน้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลสสูงสุดที่ 94% การวิเคราะห์ทางเคมีฟิสิกส์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในโครงสร้างของมัน ความเข้มข้นของซัคซิเนตที่ 78.5 และ 63.8 g/L ถูกผลิตจากไฮโดรไลเสต (L) และเศษของแข็ง (S) ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมาก่อนแล้วตามลำดับ โดยให้ผลผลิตเทียบเท่ากับ 86% โดย *E. coli* AS1600a อีกทั้งการใช้ส่วน L+S รวมกันในการหมักและการหมักพร้อมกัน (LS + SSF) ช่วยปรับปรุงการผลิตซัคซิเนตที่ความเข้มข้นและผลผลิตที่ 85.6 g/L และ 90% ตามลำดับ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 อาจนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจด้วย *E. coli* AS1600a

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Succinic Acid Production from Rice Straw by Metabolically Engineered *Escherichia coli* AS1600a

Apichai Sawisit and Kaemwich Jantama
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology

ABSTRACT

This work demonstrated a pioneer work in the pre-treatment of rice straw by phosphoric acid (H_3PO_4) for succinate production. The optimized pre-treatment condition of rice straw was at 121°C for 30 min with 2 N H_3PO_4. With this condition, total sugar concentration of 31.2 g/L with the highest hemicellulose saccharification yield of 94% was obtained. The physicochemical analysis of the pre-treated rice straw showed significant changes in its structure thus enhancing enzymatic saccharification. Succinate concentrations of 78.5 and 63.8 g/L were produced from hydrolysate liquor (L) and solid fraction (S) of the pre-treated rice straw respectively, with a comparable yield of 86% by *E. coli* AS1600a. Use of a combined L+S fraction in simultaneous saccharification and fermentation (LS+SSF) further improved succinate production at a concentration and yield of 85.6 g/L and 90% respectively. The results suggested that H_3PO_4-pre-treated rice straw may be utilized for economical succinate production by *E. coli* AS1600a.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญเรื่อง ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูปภาพ ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 4
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย 4
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 10
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 12
วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย 12
วิธีดำเนินการวิจัย 13
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 18
ผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดต่อการได้น้ำตาลกลับมาและการสร้างสารยับยั้ง 18
ผลกระทบความเป็นพิษของฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรดต่อการผลิตซัคซิเนต 21
การศึกษาลักษณะของส่วนของแข็งของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรด 22
การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดฟอสฟอริก 27
การหมักไฮโดรไลเสตส่วนที่เป็นของเหลว 31
การหมักส่วนของแข็งเซลลูโลส 33
การหมักส่วนที่เป็นของแข็งเซลลูโลส (S) และของเหลวไฮโดรไลเสต (L) 34
บทที่ 4 บทสรุป 37
สรุปผลการวิจัย 37
บรรณานุกรม 39
ประวัติผู้วิจัย 44

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิตกรดซักซินิกได้เองตามธรรมชาติที่นำมาผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรม 6
ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ของฟางข้าวที่ถูกปรับสภาพด้วยกรดต่างชนิดกันที่สภาวะที่แตกต่างกัน 19
ตารางที่ 3.2 แสดงการเปรียบเทียบส่วนประกอบทางเคมีและดัชนีความเป็นผลึกของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่ต่างกัน 24
ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณน้ำตาลและสารยับยั้งที่เกิดขึ้นระหว่างการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน 30
ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตกรดซักซินิกด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลสหลายชนิด 38

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 การตัดแต่งพันธุกรรมของ *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อสร้างสายพันธุ์ KJ122.....7
รูปที่ 2.1 แสดงแผนภูมิสรุปวิธีการดำเนินการวิจัยในการศึกษาครั้งนี้.....17
รูปที่ 3.1 แสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารละลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่สภาวะต่าง ๆ กัน ต่อการผลิตซักซิเนตของ *E. coli* AS1600a ในหลอดทดลอง, A1-A4 สำหรับ HCl, B1-B4 สำหรับ H_2SO_4, และ C1-C4 สำหรับ H_3PO_4 20
รูปที่ 3.2 การปลดปล่อยน้ำตาลของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดด้วยเอนไซม์ 4% Cel (v/v) and 0.5% Xyl (v/v). (A) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยระหว่างการย่อยด้วยกรดในเวลาที่ต่างกัน (B) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยหลังจากเวลาย่อย 120 ชั่วโมง.....23
รูปที่ 3.3 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดต่าง ๆ ที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) โดยที่ A1-A3 (ไม่ผ่านการปรับสภาพ), B1-B3 (ปรับสภาพด้วย H_3PO_4), C1-C3 (ปรับสภาพด้วย H_2SO_4) และ D1-D3 (ปรับสภาพด้วย HCl).....25
รูปที่ 3.4 แสดง X-ray diffraction diagram: XRD (A) และ FT-IR spectrum (B) ของฟางข้าวที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกมาแล้ว.....26
รูปที่ 3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพของฟางข้าวด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นและเวลาที่แตกต่างกัน (A) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยในสารละลายไฮโดรไลเสซ (B) ปริมาณสารยับยั้งที่ปลดปล่อยในสารละลายไฮโดรไลเสซ.....28
รูปที่ 3.6 แสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารละลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตซักซิเนตด้วย *E. coli* AS1600a ในหลอดทดลอง.....29
รูปที่ 3.7 แสดงการผลิตซักซิเนตด้วย *E. coli* AS1600a สารละลายไฮโดนไลเซสของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ในถังหมักขนาด 2L fermenter ภายใต้กระบวนการหมักแบบ SSF (A) 50% (v/v) (B) 70% (v/v) ไฮโดรไลเซส.....32
รูปที่ 3.8 แสดงการผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวจากส่วนที่เป็นของแข็งเซลลูโลส 70 g/L (A), 100 g/L (B), และ แบบ LS+SSF (70 g/L solid fraction และ 50% (v/v) hydrolysate liquor (C) ด้วย *E. coli* AS1600a ในถังหมักขนาด 2 L.....36

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

AM1	=	Alfredo Mertinez medium version 1
ANOVA	=	Analysis of variance
ATCC	=	American type culture collection
AOAC	=	Association of Official Analytical Chemists
CCR	=	Carbon catabolite repression
CDW	=	Dry cell weight
Cel	=	Cellulase
CFU/mL	=	Colony forming unit per Milliter (s)
CSL	=	Corn steep liquor
g	=	Gram (s)
GalP	=	Galactose permease
g/L	=	Gram (s) per liter
g/L/h	=	Gram (s) per liter per hour
HPLC	=	High performance liquid chromatography
Kg	=	Kilogram (s)
LB	=	Luria-Bertani
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
min	=	Minute (s)
mL	=	Milliliter (s)
mm	=	Millimeter (s)
N	=	Normality
OD_{550}	=	Optical density at 550 nm
% (v/v)	=	Percentage volume by volume
% (v/w)	=	Percentage volume by weight
% (w/v)	=	Percentage weight by volume
% (w/w)	=	Percentage weight by weight
PTS	=	Phosphotransferase system
vvm	=	Gas volume flow per unit of liquid volume per minute
SHF	=	Separate hydrolysate and fermentation
SSF	=	Simultaneous sacharification and fermentation
Xyl	=	Xylanase

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

ประเทศไทยมีการปลูกข้าวอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยผลผลิตส่วนใหญ่อยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภายหลังการเก็บเกี่ยวข้าวของเกษตรกรแล้ว ฟางข้าวจะเป็นของเหลือทิ้งจากการเกษตร โดยที่เกษตรกรส่วนใหญ่จะเผาฟางข้าวทิ้ง หรือไม่ปล่อยให้ย่อยสลายไปเองตามธรรมชาติซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากเนื่องจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เป็นแหล่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งสามารถใช้เป็นสารคาร์บอนทางกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารเคมีทางชีวภาพที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงเช่นกรดซักซินิก เป็นต้น โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของฟางข้าวที่สามารถย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคส รวมถึงสารประกอบเฮมิเซลลูโลสที่เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้น้ำตาลไซโลสที่จะสามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนในการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้

กรดซักซินิกเป็นตัวอย่างของกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้เป็น building-block chemical ในการผลิตสารเคมีอื่นๆ ที่สำคัญเช่น tetrahydrofuran, 1,4-butanediol, succinidiamide, succinonitrile, dimethyl succinate, N-methyl-pyrrolidone, 2-pyrrolidone, 1,4-diaminobutane, และ gamma-butyrolactone เป็นต้น เนื่องจากกรดซักซินิกมีขนาดโมเลกุลที่เล็กทำให้สามารถใช้แทนสารเคมีอื่น ๆ ที่ผลิตจากปิโตรเลียมได้ และช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารเคมีที่สังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของเบนซีนมากกว่า 250 ชนิด (Sauer และคณะ, 2008) โดยทั่วไปการผลิตกรดซักซินิกได้จากกระบวนการเติมไฮโดรเจนให้กับสารประกอบ maleic anhydride ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และเป็นกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความดันและอุณหภูมิสูง ซึ่งทำ

ให้การผลิตกรดซักซินิกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน ดังนั้นนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่พบในกระเพาะย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญ และสร้างกรดซักซินิกเป็นหลักในกระบวนการสร้าง และสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic conditions) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เช่น *Ruminococcus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Bacteroides rumimicola*, *B. succinogenes, B. amylophilus, Succinivibrio* spp., และ *Succinimonas* spp. เป็นต้น นอกจากนั้นกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดซักซินิกจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังคาดหวังที่เอื้อประโยชน์และมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม กล่าวคือแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำนวนหนึ่งโมลในทุก ๆ หนึ่งโมลของกรดซักซินิกที่ถูกผลิตขึ้น ซึ่งเราสามารถประยุกต์เอากระบวนการนี้มาลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยคาดว่าจะสามารถลดผลกระทบของภาวะเรือนกระจกที่เกิดจากก๊าซนี้ได้ ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เช่นการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตเอทานอลจากยีสต์ ถ้าเรานำเอากระบวนการหมักสองส่วนนี้ผนวกเข้าด้วยกัน แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียข้างต้นต้องการอาหารที่มีความซับซ้อนซึ่งทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง

การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน และสามารถสร้างกรดซักซินิกได้เหมือนกันในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน เช่น *Escherichia coli* ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก และมากกว่าการผลิตด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งภายในสิบปีที่ผ่านมามีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้อย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ปริมาณสูงมากขึ้นประมาณ 700 mM หรือประมาณ 80 g/L จากอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ภายใต้สภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน ซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมีชื่อว่า AS1600a (Sawisit et al., 2015) ถึงแม้ว่าการผลิตกรดซักซินิกจาก *E. coli* AS1600a ที่ได้จะเป็นที่น่าพึงพอใจ แต่อย่างไรก็ตามยังมีไม่มีการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อดังกล่าวจากฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และมีปริมาณมากในประเทศไทยเพื่อทำการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นเพื่อให้เกิดการลดต้นทุนการผลิตกรดซักซินิกอันเนื่องมาจากการใช้สารอาหารคาร์บอนราคาถูกและมีอย่างมากมายในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างสูงในการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากวัตถุดิบทั้งสองโดยพัฒนากระบวนการหมักและหาสภาวะเหมาะสมของการผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวด้วยเชื้อ *E. coli* AS1600a ดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ความสำคัญของการเป็นสารตั้งต้นที่สามารถนำไปใช้ผลิตสารสำคัญอื่น ๆ ต่อไปในอุตสาหกรรมหลายประเภท รวมถึงพอลิเมอร์ชีวภาพของกรดซักซินิกทำให้ความต้องการกรดซักซินิกที่ผลิตจากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ในตลาดโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อทดแทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตกรดซักซินิกโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาความผันผวนของราคาน้ำมันดิบในตลาดโลก อย่างไรก็ตามกำลังการผลิตของกรดซักซินิกโดยกระบวนการหมักในปัจจุบันยังไม่เพียงพอต่อ

ความต้องการเนื่องจากอัตราการผลิตกรดซักซินิกโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ที่ได้จากกระบวนการหมักยังไม่มากพอต่อการนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์โดยตรงเนื่องจากยังมีต้นทุนการผลิตเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารอาหารคาร์บอนยังมีราคาแพงเช่นกลูโคสหรือซูโครส ทำให้ส่วนแบ่งทางการตลาดของกรดซักซินิกที่ได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ยังน้อยไม่พอต่อความต้องการ

ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัยนี้เพื่อต้องการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* AS1600a โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่ไม่มีวันหมดที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือฟางข้าว ให้มีอัตราการผลิตสูง ผลผลิต และผลิตผลมากเพียงพอกับความต้องการของตลาดภายในประเทศและสามารถที่จะนำไปต่อยอดในการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อส่งออกขายในตลาดต่างประเทศต่อไป แผนงานวิจัยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยฟางข้าว (Pre-treatment process) ด้วยสารละลายกรดอ่อนเพื่อให้ได้สารละลายน้ำตาลที่มีการเจือปนของสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยฟางข้าวน้อยที่สุด

2. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* AS1600a ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (Minimal Salts Media) โดยมีแหล่งอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียวที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว โดยที่เราสามารถเปลี่ยนสารอาหารคาร์บอนเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่อย่างมากมายในประเทศไทยไปเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง

3. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* AS1600a ในถังหมักแบบกะ (Batch fermentation) ที่เป็นทั้งแบบดั้งเดิมที่ต้องย่อยวัตถุดิบก่อนการนำไปหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation) กับวิธีการใช้วิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว (Simultaneous Saccharification and Fermentation) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่นความเข้มข้นของสารอาหารคาร์บอนที่ได้จากการย่อยฟางข้าว อุณหภูมิ ความเป็นกรด และด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยฟางข้าวที่ให้อัตราการผลิต ผลผลิต และผลิตผลที่ดีกับวัตถุดิบ

4. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* AS1600a ในถังหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่เป็นทั้งแบบดั้งเดิมที่ต้องย่อยวัตถุดิบก่อนการนำไปหมัก (Separate hydrolysis and fermentation) กับวิธีการใช้วิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว (Simultaneous saccharification and fermentation) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้อัตราการผลิต ผลผลิต และผลิตผลที่ดีในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะกับวัตถุดิบที่เป็นฟางข้าว เมื่อได้ข้อมูลพื้นฐานเป็นที่เรียบร้อยแล้ว เราสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตกรดซักซินิกในอุตสาหกรรมที่มีการหมักในถังหมักขนาดใหญ่และต่อเนื่องต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* AS1600a ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีการสร้างและการสลายแล้ว โดยใช้วัตถุดิบฟางข้าวที่มีอยู่มากและเหลือทิ้งจากการทำการเกษตรภายในประเทศ ซึ่งการศึกษาวิจัยนี้จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตกรดซักซินิกด้วยกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมที่ต้องย่อยวัตถุดิบก่อนการนำไปหมัก (Separate hydrolysis and fermentation) กับวิธีการใช้วิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว (Simultaneous saccharification and fermentation) นอกจากนี้ยังจะศึกษาหาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบกะด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว ได้แก่ ค่าพีเอชของน้ำหมักระหว่างกระบวนการหมัก, อุณหภูมิในการหมัก, ความเข้มข้นของวัตถุดิบตั้งต้น, ความเข้มข้นและชนิดของเอนไซม์ผสมที่ใช้ในการย่อย เป็นต้น ตลอดจนใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการหมักแบบกะไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาการหมักด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) อีกด้วย

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เพื่อทดแทนการนำเข้าน้ำมันดิบราคาสูงจากต่างประเทศ และลดความวิตกกังวลในการขาดแคลนแหล่งน้ำมันดิบสำรองของโลก นอกจากนั้นยังเพื่อรองรับความต้องการสารเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มหาศาลในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากความต้องการใช้พลังงาน รวมถึงวัตถุดิบในการผลิตเคมีภัณฑ์ที่เกิดจากการขยายตัวของประชากรโลก และการพัฒนาเศรษฐกิจ เรามีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาวิธีการใหม่ ๆ ในการผลิตพลังงาน และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงแอลกอฮอล์ โดยไม่ต้องพึ่งพาการสังเคราะห์ทางเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งของกรดซักซินิกที่ในปัจจุบันถูกสังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของน้ำมันปิโตรเลียม ดังนั้นการผลิตกรดซักซินิกโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้จุลชีพเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาน่าจะเป็นวิถีทางเลือกที่อาจมาทดแทนการใช้น้ำมันดิบ และผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคมีภัณฑ์ด้วยปฏิกิริยาเคมีทั้งในปัจจุบัน และอนาคต

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าประเทศไทยเราเป็นประเทศที่ประชากรส่วนใหญ่ (มากกว่า 50%) ประกอบอาชีพเกษตรกรรม วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย กากใย และทะลายปาล์ม ที่มีมากมายมหาศาลยังมีศักยภาพในการเป็นชีวมวล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกข้าวอย่างแพร่หลาย ซึ่งประกอบไปด้วยเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ งานวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีที่จะนำเอาชีวมวลที่ได้จากผลิตผลทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาทำเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตสารเคมีสำคัญ รวมถึงกรดซักซินิกโดยใช้ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* AS1600a ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อรองรับความต้องการที่จะใช้กรดซักซินิกที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัสดุทางการเกษตร

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* AS1600a ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (Mineral Salts Media) โดยไม่ต้องการการ

เสริมสร้างสารอาหารเชิงซับซ้อนที่มีราคาสูง โดยงานวิจัยนี้จะนำเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* AS1600a ที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อเพื่อให้เชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตกรดซักซินิกเป็นหลักในกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยทำการทดสอบการผลิตกรดซักซินิกจากแหล่งสารอาหารคาร์บอน คือ ฟางข้าว ซึ่งเหลือทิ้งจากการทำการเกษตรด้วยกระบวนการหมักแบบกะ และกึ่งกะ ทั้งแบบที่เป็นการย่อยวัตถุดิบแล้วทำการหมัก และการย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์พร้อมกับการหมักเพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกด้วยเทคโนโลยีการหมักที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพจากวัตถุดิบทั้งสองประเภทเพื่อใช้ต่อยอดในการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น จนถึงขั้นในระดับอุตสาหกรรม

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

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

กรดซักซินิกสามารถถูกผลิตขึ้นตามธรรมชาติระหว่างกระบวนการสร้าง และสลายน้ำตาลของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่พบในกระเพาะอาหารของสัตว์ที่เคี้ยวเอื้องเช่น วัว และควาย ยกตัวอย่างเช่น *Ruminococcus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Bryant and Small, 1956) การผลิตกรดซักซินิกในเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารเชิงซับซ้อน และธาตุอาหารพิเศษบางชนิดเพื่อความต้องการในการเจริญเติบโต สังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น และวิตามินต่าง ๆ รวมถึงการสร้างกรดซักซินิกในปริมาณสูงต้องอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มาทำการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นที่เกิดจากราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ และราคาก๊าซอื่น ๆ ที่ใช้ในการทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด และเพิ่มมวลชีวภาพ

การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน และสามารถสร้างกรดซักซินิกได้เหมือนกันในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน เช่น *E. coli* ได้รับความสนใจอย่างมาก และมีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้อย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามการผลิตกรดซักซินิกจากสายพันธุ์ตั้งต้นของ *E. coli* ตามธรรมชาติอยู่ในระดับที่ต่ำมากประมาณ 10 mM จึงได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้ *E. coli* สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ปริมาณสูงมากขึ้นประมาณ 700 mM จากอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่ไม่มีการ

เสริมสารอาหารเชิงซับซ้อน และมีกลูโคสเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Jantama และคณะ, 2008b)

ตารางที่ 1.1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิตกรดซักซินิกได้เองตามธรรมชาติที่นำมาผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรม [a]

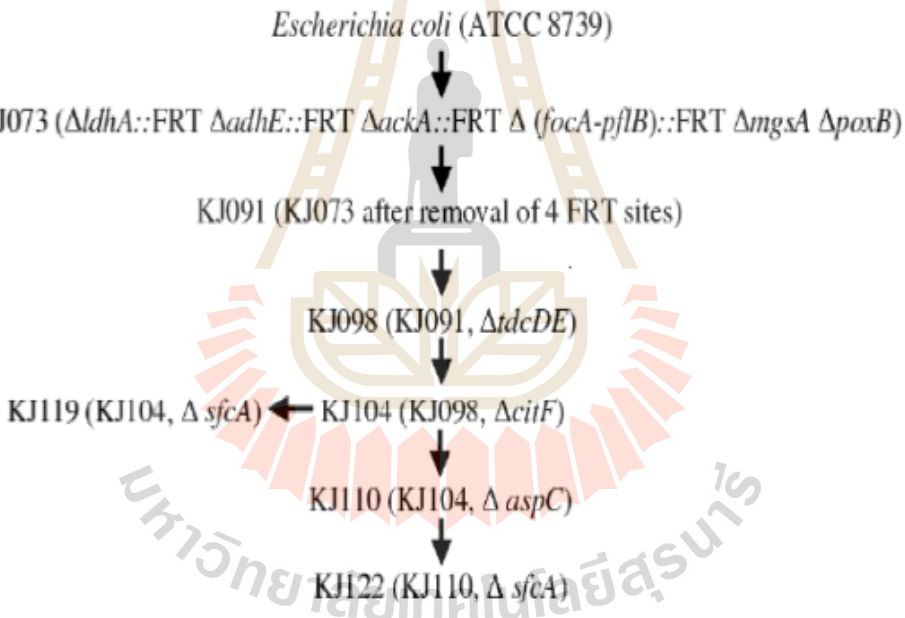
Organism	Medium/Condition[a]	Succinate Titer (mM)[b]	Reference
Actinobacillus succinogenes FZ53	130 g/l glucose supplemented with 15 g/l CSL and 5 g/l YE, 80 g/l $MgCO_3$, anaerobic batch fermentation, 78 h incubation	898 [1.36]	Guettler et al., 1996
Anaerobiospirillum succiniciproducens ATCC 53488	120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

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

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

E. coli KJ122 ถูกตัดแต่งดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ในปริมาณที่สูงในระดับห้องปฏิบัติการโดยมีอัตราการเจริญที่สูงรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่ไม่มีการเสริมสารอาหารเชิงซับซ้อน และสามารถทำการผลิตกรดซักซินิกได้ในกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะกึ่งไร้ออกซิเจนที่ความดันและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *E. coli* KJ122 นั้นถูกดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายมาจากเชื้อ *E. coli* KJ073 อีกต่อหนึ่งโดยที่สายพันธุ์นี้ถูกตัดแต่งพันธุกรรมมาจาก *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นด้วยการดัดแปลงและการทำวิวัฒนาการวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (metabolic engineering and metabolic

evolution) ซึ่ง สายพันธุ์ *E. coli* KJ073 ถูกตัดจีน *ldhA, adhE, ackA, (focA-pflB), mgsA* และ *poxB* ซึ่งยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ lactate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, acetate kinase, pyruvate formate lyase, methyl glyoxylase และ pyruvate oxidase ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่ไม่ใช่กรดซักซินิก ระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาลภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นผลให้สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดซักซินิกได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ATCC 8739) และได้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 1.2 mol succinate/mol glucose used หลังจากนั้นสายพันธ์ KJ073 ถูกนำไปพัฒนาต่อเพื่อให้สามารถสร้างกรดซักซินิกในปริมาณสูงขึ้นอีกโดยการตัดจีน *tdcDE , citF, aspC* และ *sfcA* ทำให้ได้สายพันธุ์ KJ122 (รูปที่ 1.1) โดยยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ threonine decarboxylase, citrate lyase, aspartate synthase และ malate dehydrogenase ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ KJ122 สามารถผลิตกรดซักซินิกความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตได้ (yield) เท่ากับ 1.46 mol succinate/mol glucose used และผลิตผลเฉลี่ย (average productivity) ที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 0.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



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

ตารางที่ 1.2 แสดงแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ผลิตกรดซักซินิก

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

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

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

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซิเนตในระดับความเข้มข้น และผลได้ที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีกลูโคส ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย (catabolite repression) ดังนั้น Chan และคณะ (2012) ได้เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลซูโครสของสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ด้วยยีนที่สร้างเอนไซม์สลายซูโครส (*cscA* and *cscKB*) ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ B ซึ่งมีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ตามธรรมชาติถูกโคลนและแสดงออกใน *E. coli* KJ122 โดยที่สายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่ชื่อว่า pKJSUC อยู่ได้ถูกคัดเลือกการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Phenol Red ที่มีน้ำตาลซูโครสผสมอยู่ทั้งอาหาร

เลี้ยงเชื้อแบบเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารวุ้น โคลนที่ได้สามารถแสดงอาณาเขตโคโลนีสีเหลืองใสที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น และยังแสดงความสามารถในการเจริญ และการสร้างกรดอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว

หลังจากการทำวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย *E. coli* สายพันธุ์ KJ122-pKJSUC สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซักซินิกที่มีความเข้มข้นสูงโดยมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อันไม่พึงประสงค์ในระดับต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ AM1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่ 70 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสให้กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 50.52 ± 1.8 g/L (ผลิตผล 1.05 97 g/L/h) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 500 mL ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และที่ความเข้มข้น 46.59 ± 1.23 g/L (ผลิตผล 0.97 g/L/h) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 L ภายในเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่ายาปฏิชีวนะไม่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ122-pKJSUC ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ นอกจากนั้นกรดซักซินิกถูกผลิตที่ความเข้มข้น 47.69 ± 3.94 g/L (ผลิตผล 0.99 g/L/h) จากกากน้ำตาลอ้อย 150 g/L ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในเวลา 48 ชั่วโมง จากการเพิ่มขนาดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรพบว่ากรดซักซินิกถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้น 35.14 ± 7.53 g/L และ 65.01 ± 0.64 g/L ภายในเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองได้ตารางที่ 1.2 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* KJ122-pKJSUC น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อยที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

ในปี 2014 Sawisit และคณะ ได้ทำการผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อ KJ122 จากแป้งมันและกากมันสำปะหลัง พบว่ากรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 70.08±0.12 กรัมต่อลิตรถูกผลิตขึ้นหลังจาก 72 ชั่วโมงของการหมักในกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) โดยผลผลิตเท่ากับ 1.01±0.013 กรัมต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไป ซึ่งเทียบได้เท่ากับ 0.91±0.013 กรัมต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไป และผลิตผลเท่ากับ 0.97±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นผลผลิตที่ได้เป็นจริงตามผลผลิตทางทฤษฎีซึ่งเท่ากับร้อยละ 81.25 ในกระบวนการหมักแบบกะ (SSF batch fermentation) กระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลของแป้งมันสำปะหลังควบคู่กับการหมัก (SSF) แบบกึ่งกะ สามารถเพิ่มความเข้มข้น ผลผลิต และผลิตผลของกรดซักซินิกได้ถึงร้อยละ 17.67, 2.0 และ 18.56 ตามลำดับเมื่อเทียบกับการหมักภายใต้สภาวะในกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) แบบกะ ผลผลิตที่ได้เป็นจริงตามผลผลิตทางทฤษฎีซึ่งเท่ากับร้อยละ 89.3 ตามลำดับ ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังควรจะเป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตกรดซักซินิกที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ KJ122 ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว

นอกจากนั้นพบว่าหลังจากนั้นได้ศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการย่อยควบคู่กับการหมักแบบกึ่งกะในขั้นตอนเดียว (SSF fed-batch fermentation) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร หลังการเติมสารละลายกากมันเพิ่มสองครั้งจะได้กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 98.63±0.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลิตผล 71.64±0.97 กรัม/100 กรัมกากมัน โดยเมื่อเทียบกับการผลิตแบบ SSF แบบกะนั้นความเข้มข้นและผลิตผลที่ได้จะสูงกว่าการผลิตแบบ SSF แบบกึ่งกะคิดเป็น 21.98% และ 22.62% ตามลำดับ และมีผลผลิตและผลผลิตจำเพาะเป็น 1.03±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 409 มิลลิกรัมซักซิเนตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ซึ่งเป็นค่าผลผลิตจำเพาะที่สูงสุดในการผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการ SSF แบบกึ่งกะที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้

ในการผลิตสารเคมีจากกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์จากเส้นใยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส รวมถึงชานอ้อยนั้นประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) การย่อยสลาย (hydrolysis) และการหมัก (Fermentation) โดยการเตรียมวัตถุดิบเป็นขั้นตอนการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) สามารถเข้าถึงและย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น การเตรียมวัตถุดิบทำได้ทั้งวิธีทางเคมี เช่นการย่อยด้วยกรดหรือด้วยด่าง รวมถึงวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ เป็นต้น การย่อยสลาย มี 2 วิธี คือ การใช้กรดหรือการใช้เอนไซม์ วัตถุประสงค์เพื่อช่วยเพิ่มความพรุนของเนื้อวัสดุ ลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินในเนื้อวัสดุ การย่อยด้วยกรดมี 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นการย่อยเฮมิเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลเพนโทส (pentose sugars) จากนั้นช่วงที่สองเป็นการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคส ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เล็กที่สุด ดังนั้นขั้นตอนการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นจึงมีความสำคัญเนื่องจากยิ่งปริมาณน้ำตาลที่ย่อยได้สูงจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากการหมักสูงตามไปด้วย ดังนั้นเมื่อไม่นานมานี้ ในปี 2015 Sawisit และคณะ ได้รายงานการพัฒนาสายพันธุ์ *E. coli* AS1600a ที่มาจากเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น KJ122 เพื่อที่จะสามารถใช้น้ำตาลไซโลส และสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสารเฮมิเซลลูโลสเช่น furfural, hydroxyl methyl furfural และกรดอะซิติก ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยกระบวนการวิศวกรรมเมทาบอลิก จากการศึกษาพบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดซักซินิกได้สูงถึง 0.95 กรัมซักซิเนตต่อกรัมไซโลสหรือไฮโดรไลเซสที่ใช้

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจากการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากกลูโคส ซูโครส แป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วย *E. coli* KJ122 และ AS1600a ที่ได้จะเป็นที่น่าพึงพอใจแต่ยังไม่มีงานวิจัยที่การนำเอาสารอาหารคาร์บอนที่ได้จากฟางข้าวซึ่งเป็นแหล่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมาใช้ในการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากในการที่จะนำเอาวัตถุดิบฟางข้าวมาใช้ในการผลิตกรดซักซินิกเพื่อทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มของวัตถุดิบนี้มาเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น

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

ประเทศไทยมีศักยภาพอย่างมากที่จะทำการผลิตกรดซักซินิกโดยเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพจากกระบวนการหมักเนื่องจากความพร้อมทางด้านวัตถุดิบ และความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ในการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงถูกเสนอขึ้นภายใต้กรอบแนวคิดที่จะนำเอาประโยชน์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* AS1600a ที่สามารถผลิตกรดซักซินิกจากสารอาหารคาร์บอนได้หลากหลายและอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (mineral salts medium) และมีราคาถูก ไม่ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนที่มีราคาแพงเช่น yeast extract หรือ peptone เป็นต้น การผลิตยังสามารถทำได้ที่สภาวะกึ่งมีออกซิเจน (Facultative anaerobic conditions) และมีการควบคุมสภาวะกระบวนการหมักอย่างง่ายๆ ทั้งนี้

กระบวนการผลิตของเชื้อ *E. coli* AS1600a สามารถลดข้อบกพร่องของการผลิตกรดซักซินิกแบบดั้งเดิมด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลักตามธรรมชาติ (succinate-producing bacteria) กล่าวคือในกรณีของเชื้อแบคที่เรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลักที่คัดแยกได้จากธรรมชาติส่วนมากมักจะมีอัตราการผลิตกรดซักซินิกสูงในสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างยิ่งยวด (strictly anaerobic conditions) ซึ่งยากต่อการควบคุม และมีความสิ้นเปลืองจากการเพิ่มก๊าซต่าง ๆ เข้าสู่กระบวนการผลิต เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด และเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการธาตุอาหารเสริมบางชนิดที่จำเพาะและมีราคาแพงที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามการใช้ *E. coli* AS1600a ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการผลิตกรดซักซินิกซึ่งสามารถทำได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำราคาถูก และใช้สภาวะกึ่งไร้ออกซิเจนธรรมดาที่ไม่ต้องการเพิ่มก๊าซใดๆ ในกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* AS1600a ยังต้องได้รับการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการหมักเพื่อให้เหมาะสมต่อวัตถุดิบแต่ละชนิด เช่นฟางข้าวด้วยงานวิจัยที่ต่อยอดเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

งานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษาดังนั้นความรู้และเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะถูกถ่ายทอดโดยตรงกับนักศึกษาบัณฑิตศึกษาที่กำลังอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ นอกเหนือจากนั้นงานวิจัยนี้เป็นการใช้องค์ความรู้เฉพาะทางที่มีจุดมุ่งหมายระยะยาวในการถ่ายทอดเทคนิควิธีการจากมหาวิทยาลัยไปสู่ทั้งภาคเกษตรและภาคอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักโดยเชื้อแบคทีเรียให้มีฐานการผลิตขนาดใหญ่ ที่จะเป็นเป้าหมายในการผลิตเพื่อการค้าในอนาคต

นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ทั้งหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมงานวิจัยยังมีโอกาสในการถ่ายทอดความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ที่ตนเองถนัดไปยังนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทที่สนใจเข้ามามีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยที่เสนอในแผนงานวิจัยนี้ ทั้งนี้นักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทจะมีโอกาสได้เรียนรู้การปฏิบัติงานทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างมีระบบ และเป็นแบบแผนซึ่งจะเป็นพื้นฐานการสร้างบุคคลากรทางวิทยาศาสตร์ที่มีความสามารถต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัยนี้คือการตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิทยาศาสตร์ในระดับนานาชาติ เช่น Bioresource Technology เป็นต้น ซึ่งสามารถเสนอผลงานวิจัยในแง่การพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* AS1600a ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจากสารอาหารคาร์บอนราคาถูกคือฟางข้าวนำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีจากภาคการศึกษาสู่ภาคการผลิตขนาดอุตสากรรมซึ่งจะเป็นการแก้ปัญหาราคาตกต่ำของปริมาณวัตถุดิบทางการเกษตรของกลุ่มพืชพลังงานที่ล้นตลาดเช่นอ้อย มันสำปะหลัง และฟางข้าวเป็นต้น ให้มาเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงต่อไปได้

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

ฟางข้าว

นำฟางข้าวจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทยมาตัดให้มีขนาด 1.5-2 นิ้วและอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ และมาบดต่อด้วยเครื่องปั่นให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องปั่นอาหารจนสามารถร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 5 มิลลิเมตร ฟางข้าวที่บดแล้วนี้จะถูกเก็บในที่แห้งภายในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยองค์ประกอบของฟางข้าวประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) 35.5±0.20%, เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 23.7±0.2%, ลิกนิน (lignin) 15.1±0.1%, เถ้า (ash) 14.8±0.1

เชื้อจุลินทรีย์, อาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้ใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a (Sawisit และคณะ, 2015a) ในการผลิตกรดซักซิเนต โดยได้รับความอนุเคราะห์จากคณะจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์ของเซลล์ มหาวิทยาลัยแห่งรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด AM1 (Martinez และคณะ, 2007) พร้อมกับมีการเติม $KHCO_3$ 100 mM และ betaine 1 mM

สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ ให้นำเชื้อเจริญใหม่จำนวน 1-2 โคโลนี จากบนอาหารวุ้น AM1+Xylose มาใส่ในอาหารเหลว AM1 ที่มีความเข้มข้นไซโลส (xylose) 50 g/L และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมกับควบคุม pH ที่ 7.0 และความเร็วในการกวนที่ 250 rpm หัวเชื้อนี้จะถูกเติมเข้าไปในการหมักให้มีค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (OD_{550}) ที่ 0.1 (33.3 mg CDW/L) โดยการหมักนี้ถูกทำภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนโดยการเติมไบคาร์บอเนต (bicarbonate) เพื่อทำให้ช่องว่างอากาศในถังหมักเต็มไปด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และเพื่อที่จะควบคุม pH ให้คงที่ในระหว่างที่หมักนั้น สารละลายผสมระหว่าง 6 M KOH และ 3 M K_2CO_3 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 จะถูกนำมาใช้โดยการให้สารอัตโนมัติผ่านเครื่องที่ควบคุม

เอนไซม์

เอนไซม์ทางการค้าที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ประกอบไปด้วยสารประกอบเซลลูเลส (cellulose complex) (Cel; Endoglucanase ที่ 1,800 CMC-U/mL และ β-glucosidase ที่ 775 pNG-U/mL พร้อมกับ hemicellulose อีกเล็กน้อย) และ xylanase (Xyl: 3,900 CMC-U/mL) จากบริษัท Siam Victory Chemicals จำกัด (ประเทศไทย) โดยการทำงานของเอนไซม์ที่รายงานนี้เป็นไปตามรายละเอียดของคู่มือที่ได้มาจากบริษัทที่ซื้อมา

วิธีดำเนินการวิจัย

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด

นำฟางข้าวที่บดแล้วมาเตรียมการปรับสภาพโดยแช่ในสารละลาย HCl, H_2SO_4, หรือ H_3PO_4 ที่ความเข้มข้น 1 N และใช้สัดส่วนของฟางข้าวที่ 10% (w/v, น้ำหนักแห้ง) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ที่ความดัน 15 psi) ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เป็นเวลา 15-60 นาที หลังทำการปรับสภาพ แยกส่วนประกอบต่าง ๆจากการปรับสภาพด้วยการกรองแบบสุญญากาศ เก็บส่วนที่เป็นของเหลวมาวิเคราะห์น้ำตาลและสารยับยั้ง (inhibitors) ส่วนของแข็งให้ทำการล้างด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำกรองที่ผ่านการล้างฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดมีค่า pH เป็นกลาง กรองฟางข้าวที่ย่อยนี้และนำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นจึงเก็บฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทในที่แห้งจนกระทั่งใช้งาน และนำส่วนของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ที่เป็นของเหลวซึ่งเป็นส่วนที่เต็มไปด้วยไซโลส (xylose-rich fraction) มาระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลให้เทียบเท่า 100 g/L โดยเตรียมตัวอย่างทุกตัวอย่างอย่างเป็นอิสระเพื่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

การย่อยฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์

นำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดก่อนหน้านี้มาทำการย่อยหรือไฮโดรไลซ์ต่อด้วยเอนไซม์ในขวดลูกชมพู่ขนาด 250 mL ที่ 50 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ 200 rpm โดยนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดจนได้สภาพที่เป็นของแข็งแห้งตามข้อ 2.4 มาผสมกับสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer ; pH 4.8) ในอัตราส่วน 10% (w/v, น้ำหนักแห้ง) ในขวดลูกชมพู่ขนาด 250 mL และนำไปฆ่าเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทิ้งขวดไว้ให้เย็นลง เติม Cel 4% (v/v) และ Xyl 0.5% (v/v) ลงไปในแต่ละขวด หลังจากย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ให้ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์น้ำตาลที่ได้จากฟางข้างด้วยเครื่อง HPLC และย่อยฟางข้าวที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพด้วยกรดด้วยเอนไซม์ (enzymatic saccharification) โดยใช้เป็นตัวควบคุม (control) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกับฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรด โดยทุกการทดลองทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารย่อยเหลวหรือไฮโดรไลเสต

เพื่อที่จะศึกษาผลกระทบความเป็นพิษของสารย่อยเหลวหรือไฮโดรไลเสต (hydrolysate) ของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดต่อการผลิตกรดซัคซิเนตจากเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ AS1600a การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) ถูกนำมาเป็นเครื่องมือเพื่อวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารย่อยเหลวโดยดัดแปลงวิธีจาก Geddes และคณะ

(2014) โดยทำการตรวจวัดการผลิตซัคซิเนตหลังจากบ่มไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในหลอดทดลองขนาด 13*100 mm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วยหัวเชื้อปริมาณ 10% (v/v) และไฮโดรไลเสต ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0-90% v/v) โดยปรับปริมาตรอาหาร AM1 สุดท้ายให้มีปริมาตร 4 ml และต้องปรับ pH ของไฮโดรไลเสตให้มีค่าที่ 7.0 ด้วย NH_4OH ก่อนการใช้งาน ในขณะที่สารละลายไซโลสจะถูกเติมลงไปเพื่อทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 30 g/L

ส่วนการเตรียมหัวเชื้อนั้นทำโดยการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนอาหารแข็งวุ้น AM1 ที่ประกอบไปด้วยไซโลส 5% (w/v) กวาดโคโลนีที่เจริญขึ้นใหม่บนอาหาร AM1 นี้ใส่ลงในอาหารเหลว AM1 และตามด้วยการปรับความขุ่น (OD_{550}) ให้ได้ 1.0 จากนั้นจึงนำสารละลายเซลล์มาใส่ในหลอดทดลองโดยให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น 0.1 ที่ OD_{550} (33.3 mg DCW/L) และบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำ (water bath) พร้อมกับเขย่าที่ 50 rpm สำหรับกรณีที่ต้องมีการใส่โซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) ให้เตรียมสารใหม่ขณะนั้นทันทีและเติมก่อนเติมหัวเชื้อ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 mM (ความเข้มข้นสุดท้ายของ bisulfite ที่ 1 mM เท่ากับความเข้มข้นของ metabisulfite ที่ 0.5 mM) การเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองนี้จะต้องเตรียมทั้งหมด 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำสองครั้ง

การผลิตซัคซิเนตจากฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรด

การหมักไฮโดรไลเสตเฮมิเซลลูโลสที่เป็นของเหลว

นำสารละลายไฮโดรไลเสตของฟางข้าวที่ผ่านการระเหยแล้ว (50-70%, v/v) มาผสมกับไซโลสให้มีความเข้มข้นน้ำตาลรวมเริ่มต้นที่ 100 g/L เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตกรดซัคซิเนตด้วยเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ AS1600a ภายใต้สภาวะการหมักหลังจากการย่อย (separate hydrolysate and fermentation; SHF) โดยทำการทดลองการหมักแบบกะ SHF ในถังหมักขนดบรรจุขนาดเล็ก 500 mL โดยมีปริมาตรน้ำหมักเพียง 350 mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับควบคุม pH ที่ 7.0 และมีความเร็วในการกวน 120 rpm เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อลดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสต NH_4OH ถูกนำมาเติมเพื่อปรับ pH ของไฮโดรไลเสตให้เท่ากับ 9.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาหมักดังคำอธิบายที่ให้ไว้ก่อนหน้านี้ (Geddes และคณะ, 2014) โดยการบ่มนี้จะทำให้ pH ของไฮโดรไลเสตลดลงเหลือประมาณ 7.5 นอกจากนี้จะต้องเติมโซเดียมไบซัลไฟต์ที่เตรียมใหม่ทันทีก่อนการเติมหัวเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM เพื่อลดความเป็นพิษ และเก็บตัวอย่างเป็นช่วง ๆเพื่อนำมาวิเคราะห์ในระหว่างการหมัก โดยทุกการทดลองจะต้องทำอย่างน้อย 3 ครั้ง

การหมักเซลลูโลสส่วนที่เป็นของแข็ง

นำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่เป็นส่วนของแข็งมาเป็นสารตั้งต้นเพียงชนิดเดียวเพื่อการผลิตซัคซิเนตภายใต้การหมักพร้อมกับการย่อย (simultaneous saccharification and fermentation; SSF)

โดยทำการทดลองการหมักแบบกะ SSF ในถังหมักขนาด 2 L ด้วยปริมาตรในการหมักเริ่มต้น 1.2 L นำส่วนผสมของฟางข้าวที่เตรียมไว้นี้และน้ำใส่ลงไปในถังหมักและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงค่อยเติมอาหาร AM1 ลงไป ตามมาด้วยหัวเชื้อ และเติม Cel 4% (v/w) เป็นลำดับสุดท้าย โดยสภาวะการหมักแบบ SSF ในการทดลอง ทำโดยการควบคุมอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส และควบคุม pH ที่ 6.5 พร้อมกับปรับความเร็วในการกวนที่ 300 rpm เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์เป็นช่วง ๆ ทุก 24 ชั่วโมง โดยทุกการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

การหมักโดยใช้ทั้งส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวไฮโดรไลเสต

ในการหมักแบบใช้สารตั้งต้นที่เป็นของเหลวและของแข็งนั้นทำได้โดยการนำของเหลวไฮโดรไลเสตที่ผ่านการระเหยมารวมกับส่วนที่เป็นของแข็งเซลลูโลสที่ได้จากฟางข้าวซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรด (LS) เพื่อการผลิตกรดซัคซิเนตภายใต้การหมักแบบ LS+SSF โดยการนำฟางข้าวบดแห้งที่ปรับสภาพด้วยกรด H_3PO_4 ปริมาณ 7% (w/v) ใส่ลงไปในถังหมักพร้อมน้ำบางส่วน และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วรอถังหมักเย็นลง แล้วจึงเติมส่วนของเหลวไฮโดรไลเสตที่ผ่านการลดความเป็นพิษให้มีความเข้มข้น 50% (v/v) และอาหาร AM1 ลงไปโดยให้มีปริมาตรสุดท้ายที่ 1.2 L ในถังหมักขนาด 2 L โดยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมนี้มีอยู่ประมาณ 100 g/L และหลังจากเติมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้ว จึงค่อยเติมเอนไซม์ Cel (4% v/w) ลงไป การควบคุมการหมักแบบกะ LS+SSF จะทำในลักษณะเดียวกันกับการหมักแบบกะ SSF โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส และ pH ที่ 6.5 พร้อมกับปรับความเร็วในการกวนที่ 300 rpm และทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์เป็นช่วง ๆ ทุก 24 ชั่วโมงโดยทุกการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

การวัดผลิตภัณฑ์จากการหมัก ฟูแรน และมวลเซลล์

น้ำหมักจะถูกนำออกมาจากถังหมักในระหว่างการหมักเพื่อวัดมวลเซลล์ กรดอินทรีย์ ฟูแรน (furan) และน้ำตาลที่ใช้ในการหมัก (fermentable sugars) การคำนวณมวลเซลล์นั้นทำได้โดยการประเมินจากความขุ่นเซลล์ (0.33 mg of DCW/mL/OD) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Bausch & Lomb spectronic 70 โดยน้ำหมักปริมาณ 1 mL จะถูกเก็บมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อกำจัดการรบกวนของสี จากนั้นนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียให้กลับมาละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 mL ก่อนที่นำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 550 nm น้ำตาล ฟูแรน และกรดอินทรีย์ จะถูกวิเคราะห์ด้วย HPLC Agilent Technologies 1200 series HPLC systems โดยการวิเคราะห์น้ำตาลและ ฟูแรนจะใช้กับคอลัมน์ Aminex HPX-87P ion exclusion column (80 องศาเซลเซียส; ใช้น้ำบริสุทธิ์ระดับนาโนเป็น mobile phase, 0.6 mL/min) ในขณะที่การวิเคราะห์กรดอินทรีย์จะวิเคราะห์ด้วย Aminex HPX column (45 องศาเซลเซียส; ใช้น้ำสารละลาย H_2SO_4 เป็น mobile phase, 0.4 mL/min) การวิเคราะห์น้ำตาล ฟู

แรน และกรดอินทรีย์จากน้ำหมักจะใช้ส่วนใสของน้ำหมักที่แยกได้จากการปั่นเซลล์เพื่อเตรียมวัดความขุ่นก่อนหน้านี้มาทำการกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรู 0.2 µm เพื่อนำไปวิเคราะห์ HPLC

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและและด้านเคมีกายภาพ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าวทั้งที่มีการปรับสภาพและไม่ได้ปรับสภาพด้วยกรด ซึ่งประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จะใช้วิธีตาม Van Soest และคณะ (1991) และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM; Jeol-JSM-6010LV) ในการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและลักษณะพื้นผิวของฟางข้าว โดยการนำตัวอย่างของฟางข้าวทั้งแบบที่ได้ปรับสภาพด้วยกรดและไม่ได้ปรับสภาพมาทำการยึดบนที่เกาะตัวอย่าง และทำการพ่นตัวอย่างด้วยทองก่อนที่จะนำมาส่องด้วยกล้อง SEM ด้วยความต่างศักย์เร่งที่ 5 kv นอกจากนี้ความเป็นผลึกของตัวอย่างจะถูกทำการวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD ; Bruker D2 phaser) โดยที่ตัวอย่างถูกแสกนในช่วง 2θ จาก 10°-30° และแสดงความเป็นผลึกของตัวอย่างด้วยค่าดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index ; CrI) (Hsu และคณะ, 2010) โดยใช้สมการดังนี้

$$CrI = (I_{002}-I_{am})/I_{002}*100$$

โดยที่ I_{002} เป็นความเข้มของพีค 002 ที่ 2θ = 22.4 ° และ I_{am} คือความเข้มของการกระจายพื้นหลัง (background scatter) ที่ 2θ = 18.7 ° และใช้ FT-IR spectrometry (Tensor 27-FTIR, Germany) ในการวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างของตัวอย่าง ค่าสเปคตรัมที่ได้มาที่ค่า resolution 2 cm^{-1} ในช่วง 400-4000 cm^{-1}

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ซอฟต์แวร์ SPSS (SPSS 17.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL) ใช้ในการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้ข้อมูลของตัวอย่างสามซ้ำในการทดสอบแต่ละการทดสอบพร้อมกับหาค่าเฉลี่ยและใช้การทดสอบ Duncan's multiple-ranges test (DMRT) ในการหาค่าความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

วิธีการคำนวณ

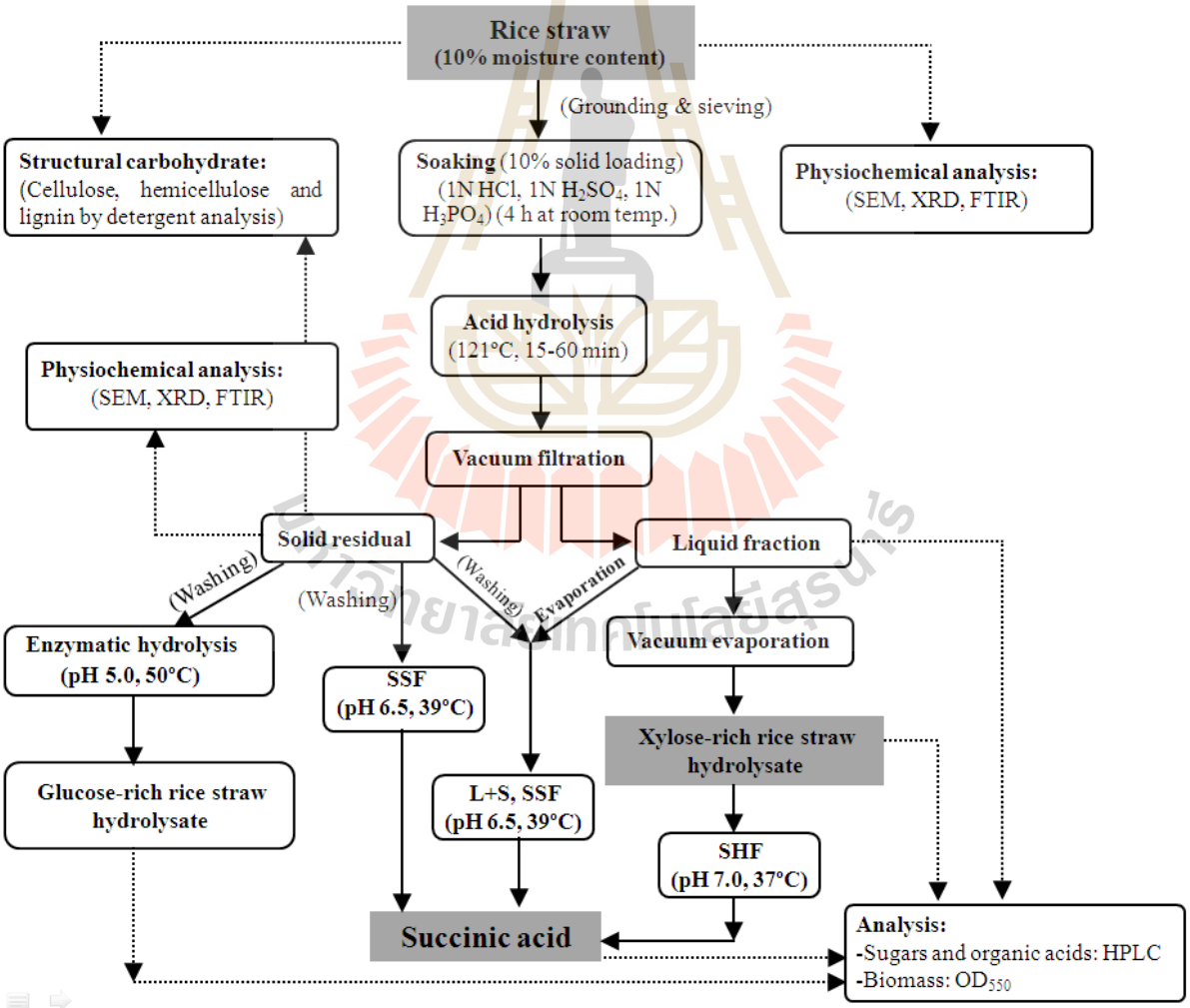
ทำการหาอัตราส่วนเปอร์เซ็นต์ของการย่อยเซลลูโลส (cellulose saccharification; %CS) และการย่อยเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose saccharification; %HF) โดยคำนวณผลผลิต (yield) ของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (กลูโคส และกาแล็คโตส) และน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (ไซโลส และอะราบิโนส) ซึ่งได้มาจากการย่อยฟางข้าวด้วยกรดหรือเอนไซม์ตามวิธีที่อธิบายใน Ma และคณะ. (2009) เปอร์เซ็นต์ของการย่อยเซลลูโลส (%CS) ถูกแสดงออกในรูปแบบของกรัมของเซลลูโลสที่ถูกย่อยต่อกรัมของฟางข้าวที่ไม่ได้ทำการ

ปรับสภาพหรือทำการปรับสภาพด้วยกรดที่ใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis reaction) โมเลกุลของน้ำที่ใส่เข้าไปในกระบวนการไฮโดรไลซิสของโพลิเมอร์เซลลูโลส (cellulose polymer) ถูกนำมาคิดโดยการคูณค่ากลูโคสด้วย 0.9 ดังสมการดังต่อไปนี้

%CS = 100*(กรัมกลูโคส และเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้น*0.9/กรัมเซลลูโลสในฟางข้าวที่ใส่ไป)

ส่วนองค์ประกอบของไซโลสและอะราบิโนสที่ปล่อยออกมาจากฟางข้าวถูกใช้ในการประเมินค่า %HS ไซโลส และอะราบิโนส เป็นน้ำตาลที่สำคัญที่สุดของเฮมิเซลลูโลส และมีปริมาณที่น่าสนใจในฟางข้าว โดยคำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

%HS = 100*(กรัมไซโลส และอะราบิโนสที่เกิดขึ้น/กรัมเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวที่เติม)



รูปที่ 2.1 แสดงแผนภูมิสรุปวิธีการดำเนินการวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

บทที่ 3
ผลการทดลองและการอภิปราย

ผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดต่อการได้น้ำตาลกลับมาและการสร้างสารยับยั้ง

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ HCl, H_2SO_4 และ H_3PO_4 ถูกนำมาศึกษา โดยตารางที่ 3.1 แสดงผลของน้ำตาลที่ได้จากฟางข้าวและสารยับยั้ง (inhibitors) ในของเหลวไฮโดรไลเสตหลังทำการย่อยด้วยกรดต่าง ๆ ซึ่งไซโลสถือเป็นน้ำตาลหลักที่ได้จากของเหลวไฮโดรไลเสต ตามมาด้วยกลูโคสและอะราบิโนส ตามลำดับ พร้อมกับเซลโลไบโอสและกาแล็คโตสอีกเล็กน้อย นอกจากนี้น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อพบว่า %HS ที่ได้มาจากทุกทรีตเมนต์ (treatment) ที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดมีค่าสูงกว่า %CS อย่างมีนัยสำคัญ สิ่งนี้อาจถูกอธิบายว่าเฮมิเซลลูโลสมีมวลโมเลกุล และปริมาณลิกนิน รวมไปถึงมีรูปร่างอสัณฐานที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูโลส ดังนั้นจึงอาจทำให้ถูกไฮโดรไลซ์หรือถูกย่อยด้วยกรดได้ง่าย (Dagino และคณะ, 2013) นอกจากนี้ตารางที่ 3.1 ยังเปิดเผยถึงความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการเพิ่มเวลาในการปรับสภาพด้วยกรดจากเวลาที่ 15-45 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการลดลงเล็กน้อยของความเข้มข้นของน้ำตาลโดยรวมสามารถสังเกตได้ในไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วย HCl และ H_2SO_4 เมื่อปล่อยเวลาในการทำปฏิกิริยานานถึง 60 นาที

ในบรรดาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดทั้ง 3 ชนิด พบว่าการปรับสภาพด้วยกรด HCl มีประสิทธิภาพในการทำให้ฟางข้าวเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลได้มากที่สุด โดยพบว่าทำให้ได้ค่าเฉลี่ยน้ำตาลรวมประมาณ 31 g/L และสามารถให้ค่า %HS สูงถึง 92% ภายใน 15 นาที อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาจาก 15 นาทีเป็น 60 นาที กลับเป็นผลให้ความเข้มข้นน้ำตาลรวม และ %HS ลดลง ในขณะที่การปรับสภาพด้วยกรด H_3PO_4 นั้นพบว่ามีความสามารถในการให้น้ำตาลออกมาต่ำสุดในสภาวะการปรับสภาพแบบเดียวกัน โดยพบว่าถึงแม้จะมีการเพิ่มเวลาสูงถึง 60 นาที แต่ กรด H_3PO_4 ก็ไม่ได้ส่งผลให้การปล่อยน้ำตาลจากฟางข้าวและ %HS เพิ่มขึ้น เพราะทั้งสองอย่างยังคงต่ำเท่าเดิม ไม่ว่าจะเป็นที่ 15 หรือ 30 นาที เพราะฉะนั้นถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยฟางข้าวด้วยกรด H_3PO_4 อาจต้องทำการเพิ่มความเข้มข้นหรือใช้ระยะเวลานานกว่า 60 นาที และเมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่ในการแตกตัว (dissociation constant ; K_a) ที่ความเข้มข้นเดียวกันในกรดทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่า K_a ของกรด HCl มีค่าสูงกว่า H_2SO_4 และ H_3PO_4 (Urbaneja และคณะ, 1996) ดังนั้นการที่ HCl สามารถแตกตัวให้ไอออน H^+ ได้มาก ก็อาจจะเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดอัตราการย่อยองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloose) ในฟางข้าวได้มากกว่า จึงให้ความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงที่สุด

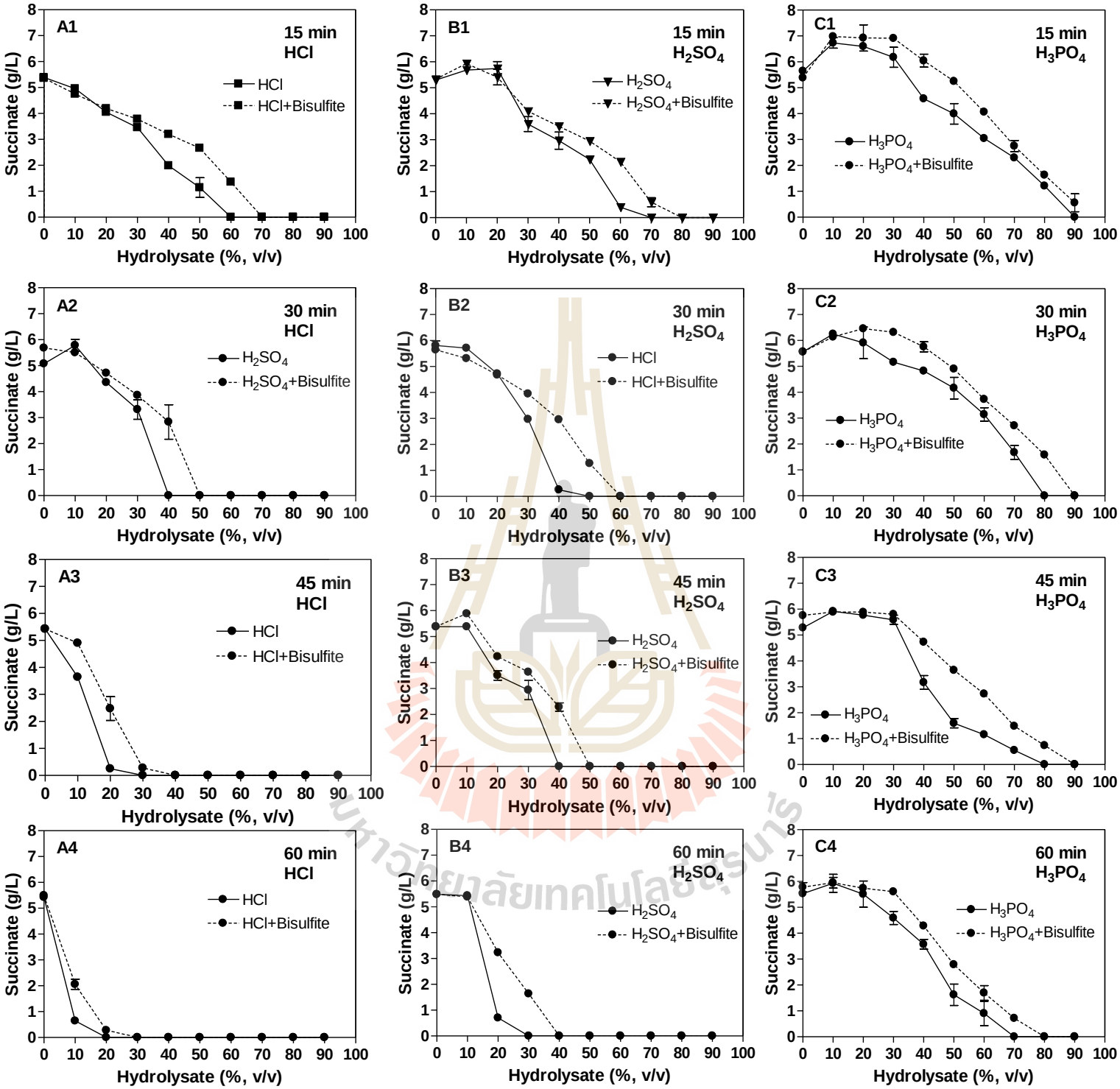
ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ของฟางข้าวที่ถูกปรับสภาพด้วยกรดต่างชนิดกันที่สภาวะที่แตกต่างกัน

Acids (1N)	Pretreatment time (min)	Sugars concentration (g/L, on dry basis)						Saccharification yield (%)		Inhibitor concentration (g/L, on dry basis)				
		Glucose	Xylose	Arabinose	Cellobiose	Galactose	Total sugars	%CS$^{\beta}$	%HS$^{\gamma}$	Furfural	HMF	Formic acid	Acetic acid	Total inhibitors
H_3PO_4	15	3.19±0.2	8.0±0.1	2.3±0.1	1.4±0.1	0.1±0.0	14.9±0.4$^{\alpha,h}$	11.7±0.6	43.2±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.1	0.6±0.1^{j}
	30	4.15±0.2	12.8±0.2	2.7±0.1	1.2±0.1	0.3±0.1	21.1±0.5^{g}	13.5±0.4	65.3±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.2±0.1	1.2±0.1^{i}
	45	4.61±0.3	15.6±0.1	2.8±0.1	1.1±0.1	0.3±0.0	24.5±0.4^{f}	14.4±0.6	78.1±0.7	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	1.4±0.1	1.9±0.0^{h}
	60	5.42±0.6	16.6±0.1	3.2±0.1	1.0±0.2	0.4±0.0	26.6±0.1^{e}	16.3±0.2	83.6±0.4	0.1±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1	1.5±0.1	2.3±0.1^{g}
H_2SO_4	15	3.9±0.1	12.4±0.6	3.3±0.0	0.9±0.0	0.8±0.1	21.2±0.8^{g}	12.2±0.3	66.1±2.5	0.2±0.0	0.7±0.0	0.7±0.1	2.2±0.3	3.7±0.4^{f}
	30	8.7±0.1	18.9±0.1	3.3±0.0	1.1±0.1	0.8±0.0	32.8±0.1^{b}	24.9±0.3	93.6±0.2	0.2±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	2.7±0.1	4.4±0.0^{e}
	45	9.5±0.3	18.7±0.3	3.1±0.1	1.1±0.1	0.9±0.0	33.2±0.1^{a,b}	26.8±0.7	91.8±1.4	0.4±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	2.8±0.0	4.8±0.1^{d}
	60	9.2±0.2	18.8±0.1	3.1±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	32.6±0.1^{b}	25.1±0.4	92.3±0.8	0.4±0.0	0.9±0.0	0.9±0.1	2.9±0.1	5.1±0.1^{c}
HCl	15	7.3±0.1	18.2±0.2	3.7±0.2	0.8±0.2	0.8±0.0	30.9±0.2^{d}	20.6±0.4	92.4±0.3	0.3±0.0	0.9±0.0	0.7±0.0	2.6±0.1	4.5±0.1^{e}
	30	9.4±0.3	18.8±0.1	3.33±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	33.1±0.3^{a,b}	25.7±0.7	93.2±0.6	0.9±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0	2.7±0.1	4.9±0.1^{c,d}
	45	10.0±0.1	18.5±0.2	3.26±0.1	1.1±0.1	0.8±0.0	33.7±0.2^{a}	28.1±0.3	91.9±1.4	0.4±0.0	1.2±0.1	0.9±0.0	2.8±0.1	5.4±0.1^{b}
	60	8.6±0.2	18.3±0.2	3.03±0.1	0.8±0.1	0.8±0.0	31.5±0.2^{c}	23.9±0.3	90.1±1.3	0.5±0.0	1.6±0.0	1.1±0.1	3.0±0.0	6.1±0.2^{a}

$^{\alpha}$ ตัวห้อยที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

$^{\beta}$ %CS = 100*(กรัมกลูโคส และเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้น*0.9/กรัมเซลลูโลสในฟางข้าวที่เติม)

$^{\gamma}$ %HS = 100*(กรัมไซโลส และอะราบิโนสที่เกิดขึ้น/กรัมเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวที่เติม)



รูปที่ 3.1 แสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารละลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่สภาวะต่าง ๆ กัน ต่อการผลิตซักซิเนตของ *E. coli* AS1600a ในหลอดทดลอง, A1-A4 สำหรับ HCl, B1-B4 สำหรับ H_2SO_4, และ C1-C4 สำหรับ H_3PO_4

การปรับสภาพด้วยกรดไม่ได้เพียงทำให้องค์ประกอบส่วนของลิกโนเซลลูโลสแตกออกและช่วยให้เกิดการปล่อยโมโนเมอร์โพลีแซ็คคาไรด์ (polysaccharide monomers) ออกมาเท่านั้น แต่ยังเป็นผลให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์การย่อยโพลีแซ็คคาไรด์ได้ด้วยซึ่งมักจะเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Li et al., 2010) โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดว่าการใช้ HCl และ H_2SO_4 เพื่อปรับสภาพฟางข้าวทำให้เกิดการสร้างสารยับยั้งออกมาในระดับที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วย H_3PO_4

Rajan และคณะ (2014) พบว่าการปรับสภาพฟางข้าวสาลีด้วย H_2SO_4 เป็นผลให้ทั้งน้ำตาลและสารยับยั้งเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาจาก 10-60 นาที ส่วน Thongchul และคณะ (2010) รายงานในทำนองเดียวกันว่าการปรับสภาพด้วยกรดที่นานเกินไปในการย่อยกากมันสำปะหลัง (cassava pulp) เป็นผลให้ได้น้ำตาล (sugar yield) ลดลง ในตารางที่ 3.1 สารยับยั้งที่ถูกผลิตออกมาในระหว่างการปรับสภาพ ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ของฟูแรน (furfural และ 5-hydroxymethyl furfural; HMF) และกรดอินทรีย์ (กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพอย่างชัดเจน Furfural และ HMF นั้นได้มาจากการถูกนำน้ำออกจากโมเลกุลของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม ส่วนกรดฟอร์มิกนั้นได้มาจากการสลาย (decomposition) ของ HMF และ acetic acid ได้มาจากการ deacetylation ของเฮมิเซลลูโลส (Mittal และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามพบสารยับยั้งทั้งหมดต่ำที่สุดในฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วย HCl และ H_2SO_4 ตามลำดับ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนพร้อมกับใช้เวลาระยะสั้นๆอาจเหมาะสมสำหรับการลดการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (byproduct) ที่ไม่ต้องการ

ผลกระทบความเป็นพิษของฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรดต่อการผลิตซัคซิเนต

ความเป็นพิษของไฮโดรไลเสตซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการย่อยด้วยกรดถูกศึกษาเบื้องต้นโดยการใช้เชื้อ *E. coli* AS1600a เติมเข้าไปในไฮโดรไลเสตหลังจากชั่วโมงที่ 48 และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นในการยับยั้งขั้นต่ำสุด (MIC, % v/v) ของไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่ถูกปรับสภาพแล้วอาจจะยับยั้งการเจริญของ *E. coli* AS1600a โดยสมบูรณ์ถูกทดสอบ และทำการประเมินผลการผลิตซัคซิเนต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้จากการปรับสภาพด้วยกรดที่เวลามากขึ้นจะช่วยลดระดับ MIC ให้น้อยลง ส่งผลให้การการผลิตซัคซิเนตสำหรับเชื้อสายพันธุ์นี้ลดลงตามด้วย เมื่อเปรียบเทียบด้านความเป็นพิษพบว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการปรับสภาพด้วย HCl มีผลกระทบในการทำให้เกิดการยับยั้งมากที่สุดในการผลิตกรดซัคซิเนตเมื่อเปรียบเทียบกับกรดที่เหลือคือ H_2SO_4 และ H_3PO_4 ตามลำดับ ในทุกสภาวะที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 3.1) โดยเกิดสร้างสารยับยั้งสูงสุดที่ความเข้มข้น 6.1±0.1 g/L จากการย่อยด้วยกรด HCl ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ซึ่งสารเหล่านี้ประกอบไปด้วย กรดอะซิติก 3.0±0.1 g/L กรดฟอร์มิก 1.1±0.1 g/L furfural 0.5±0.0 g/L และ HMF 1.6±0.2 g/L โดยสารเหล่านี้มีค่าสูงกว่าถึง 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 (2.3±0.1 g/L) (ตารางที่ 3.1) ระดับ MIC ของไฮโดรไลเสตที่ทำการปรับสภาพด้วย

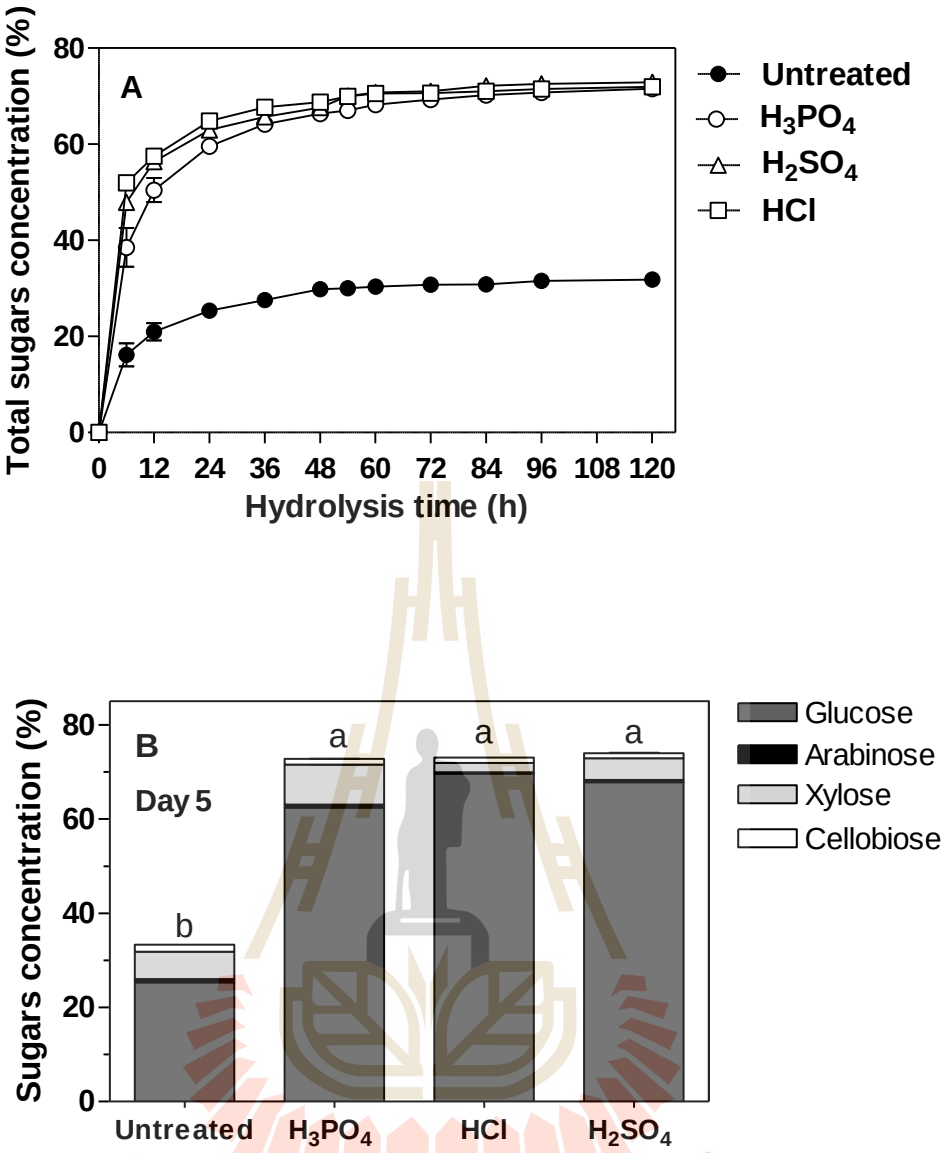
HCl ค่อนข้างต่ำมากที่ 20% (v/v) ในขณะที่ไฮโดรไลเสตที่ปรับสภาพด้วย H_3PO_4 มีค่าของ MIC สูงถึง 80% (v/v) สำหรับ *E. coli* AS1600a ในระหว่างการผลิตซัคซิเนต

Ballongue และคณะ (1987) รายงานว่าการลดลงของอัตราการเจริญสูงสุดของ *Clostridium acetobutyricum* ถูกสังเกตได้จากที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 4 g/L ในขณะที่ Guo และคณะ (2008) รายงานว่ากรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 2 g/L ยับยั้งการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Pichia stipites* อย่างชัดเจน ส่วน Wang และคณะ (2011) ให้ความเห็นว่ากรดฟอร์มิกอาจจะถูกพิจารณาว่าเป็นสารยับยั้งที่รุนแรงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะซิติกโดยพวกเขาแสดงให้เห็นว่าการเติมกรดฟอร์มิกประมาณ 0.004 g/L ในไฮโดรไลเสตข้าวโพดบด (corn mash hydrolysate) ทำให้เกิดการสะสมกรดมาก ๆ ในระยะเวลาสั้นพร้อมกับลดการผลิตตัวทำละลายจาก *C. acetobutyricum* นอกจากนี้ Liu และคณะ (2018) ยังรายงานด้วยว่า furfural ที่ความเข้มข้น 1.2 g/L ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ *C. tyrobutyricum* อย่างสมบูรณ์ และไม่พบการผลิตกรดบิวทิริกจากเชื้อสายพันธุ์นี้เมื่อความเข้มข้นของ HMF ที่ระดับ 2.4 g/L

การศึกษาลักษณะของส่วนของแข็งของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรด

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเคมีของฟางข้าวก่อนและหลังทำการปรับสภาพด้วยกรดถูกเห็นได้อย่างชัดเจนในส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางเบื้องต้นทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์หรือย่อยองค์ประกอบพวกเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พร้อมกับทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลสในฟางข้าวส่วนที่เป็นของแข็งที่ทำการปรับสภาพด้วยกรด โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบเซลลูโลสในฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรด (ประมาณ 70%, w/w) เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าการปรับสภาพช่อดอกผลปาล์มน้ำมัน (oil palm empty fruit) และชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกและฟอสฟอริกทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นขององค์ประกอบเซลลูโลส (Isroi และคณะ 2011; de Vasconcelos และคณะ 2013)

ในการศึกษาของงานชิ้นนี้ ส่วนของของแข็งจะถูกทำให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เอนไซม์ทางการค้าผสม (4% Cel + 0.5% Xyl) ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอัตราการปล่อยน้ำตาลจากฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพในทุกสภาวะในระหว่างการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการย่อยในช่วง 8 ชั่วโมงแรก อย่างไรก็ตามการปล่อยน้ำตาลจากฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรดแก่เกิดขึ้นรวดเร็วกว่าการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน ($HCl \geq H_2SO_4 > H_3PO_4$) ในช่วงการบ่มที่ 10-60 ชั่วโมง หลังจากนั้นน้ำตาลรวมจากฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยชนิดต่าง ๆเริ่มคงที่ (ภาพที่ 3.2A) และพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ปลดปล่อยออกมา (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 72.2±0.7%) จากฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรดชนิดต่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 3.2B) หลังจากการย่อยผ่านไป 120 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 การปลดปล่อยน้ำตาลของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดด้วยเอนไซม์ 4% Cel (v/v) and 0.5% Xyl (v/v). (A) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยระหว่างการย่อยด้วยกรดในเวลาที่ต่างกัน (B) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยหลังจากเวลาย่อย 120 ชั่วโมง (บาร์แม่งที่มีตัวอักษรที่ต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณน้ำตาลที่ความเชื่อมั่น 95% $p<0.05$).

ภาพจากการใช้กล้อง SEM ในการตรวจสอบฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรดยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างพื้นผิวซับซ้อนไปเป็นโครงสร้างอย่างง่ายเนื่องจากสลายโครงสร้างผนังและการทำลายของโครงสร้างเส้นใยไปสู่ขนาดอนุภาคขนาดเล็ก (รูปที่ 3.3) นอกจากนี้ดัชนีความเป็นผลึก (CrI) จากข้อมูล XRD (ตารางที่ 3.2) แสดงให้เห็นถึงความเข้มของพีคของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพ สิ่งนี้แสดงให้เห็นถึงเฮมิเซลลูโลสและส่วนของเซลลูโลสอสัณฐานถูกย้ายออก พร้อมกับเหลือส่วนของความเป็นผลึกไว้ข้างหลัง (Hsu และคณะ, 2010) หลังจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด H_3PO_4, H_2SO_4 , และ HCl พบว่าค่า CrI เพิ่มขึ้นจาก 47.3±0.6% (ไม่ปรับสภาพ) เป็น 54.9±0.8%, 57.1±1.0%, และ 58.5±0.9% ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของค่า CrI เป็นอย่างน่าสนใจ ที่ได้มาจากฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของอัตราการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 3.4A โดยคำนึงถึงการวิเคราะห์ FT-IR แถบช่วงกว้าง (broad band) ที่สังเกตได้ในช่วง 3300 cm^{-1} ซึ่งแสดงให้เห็นว่า หมู่ O-H ของพันธะไฮโดรเจนของเซลลูโลสถูกทำลาย พร้อมกับการเพิ่มให้สารเข้าถึงเซลลูโลสได้ง่าย (Rahnama และคณะ 2013) ความเข้มของสัญญาณลดลงที่ 1720 และ 1621 cm^{-1} (บ่งบอกถึงการยืดของพันธะ C=O ของ acetyl หรือ carboxylic acid ในเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน) ซึ่งแสดงถึงการสลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินในระหว่างการปรับสภาพด้วยกรด (Hsu และคณะ, 2010)

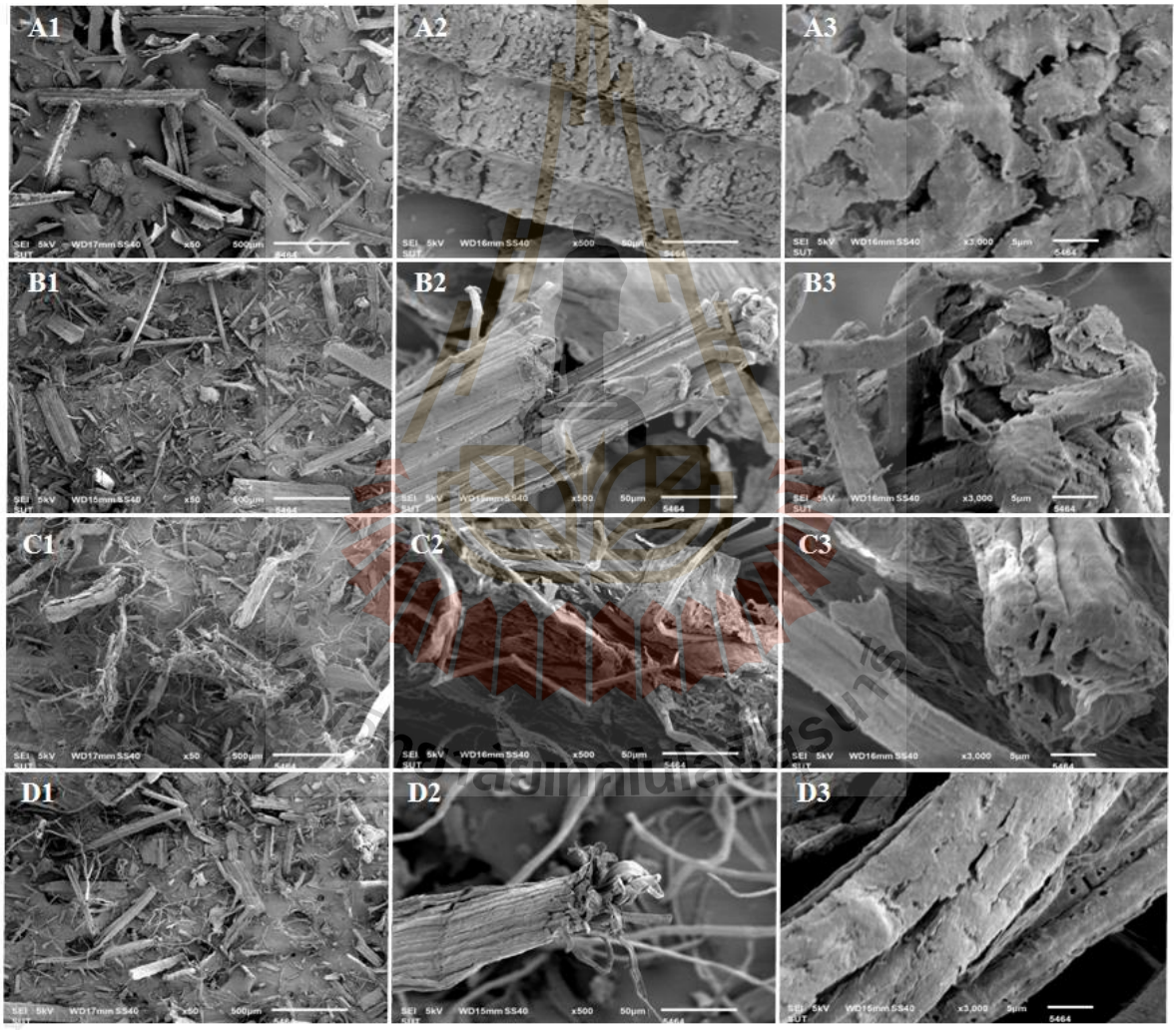
ตารางที่ 3.2 แสดงการเปรียบเทียบส่วนประกอบทางเคมีและดัชนีความเป็นผลึกของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่ต่างกัน

Rice straw	Chemical components (%)			Crystallinity index (%)
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	
Untreated	35.5±0.20$^{\beta,a}$	23.7±0.2^{a}	15.1±0.1^{a}	47.3±0.6^{a}
H_3PO_4 (1N)	70.5±0.1^{b}	10.0±0.4^{b}	10.1±0.1^{b}	54.9±0.8^{b}
HCl (1N)	68.3±0.1^{c}	2.7±0.0^{c}	9.0±0.1^{c}	58.5±0.9^{c}
H_2SO_4 (1N)	71.6±0.1^{d}	6.2±0.6^{d}	9.3±0.0^{c}	57.1±0.8^{d}

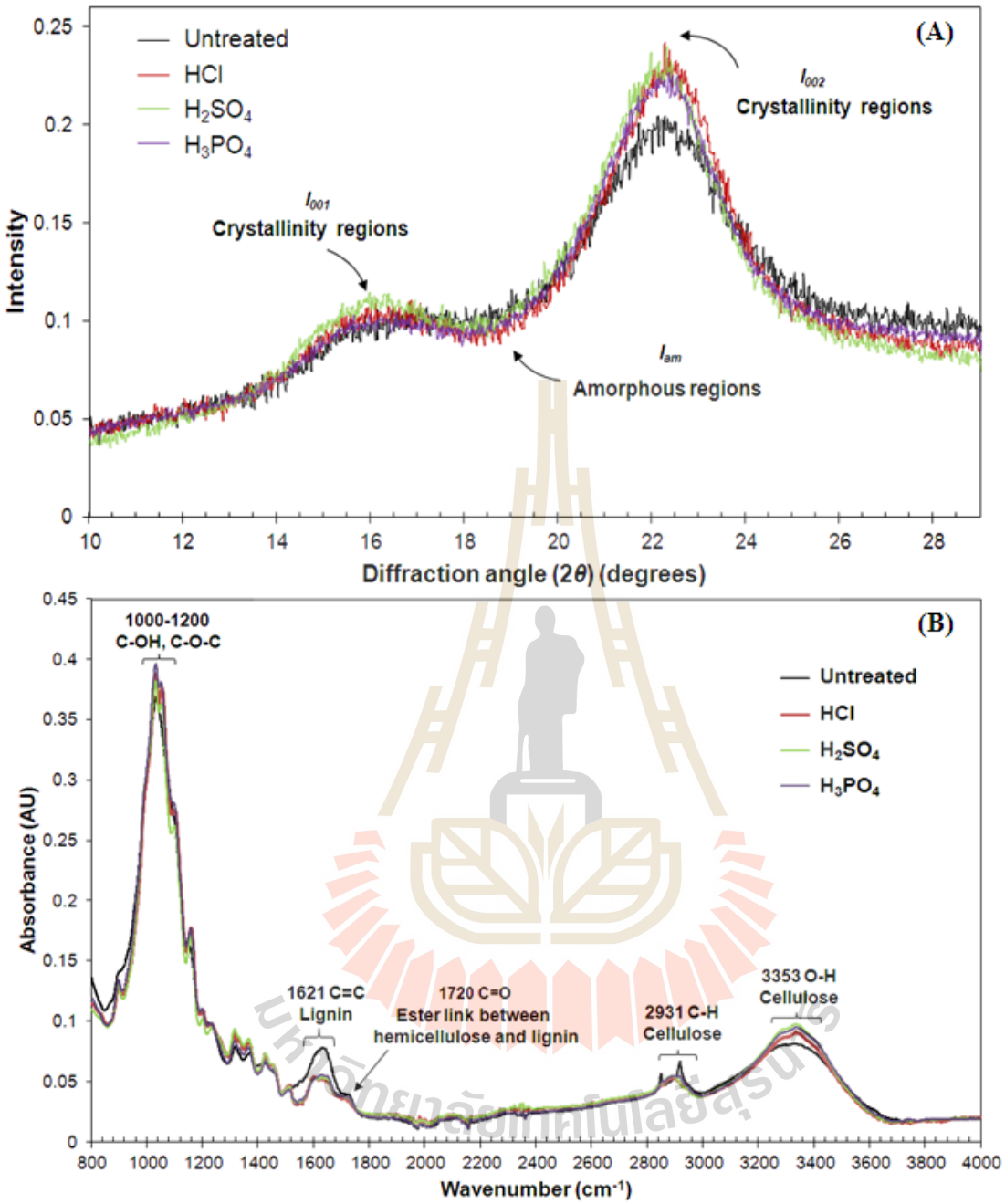
$^{\beta}$ ตัวห้อยที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากการวิเคราะห์ส่วนของแข็งหลังจากการปรับสภาพด้วยกรดโดยกล้อง SEM (รูปที่ 3.3), XRD และ FT-IR (รูปที่ 3.4) พบว่าการปรับสภาพฟางข้าวด้วย H_3PO_4 มีประสิทธิภาพมากกว่าที่จะใช้ทำการปรับสภาพฟางข้าวเพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการหมักในขั้นต่อไปเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วย HCl และ H_2SO_4 ในแง่ของความเป็นพิษของไฮโดรไลสตและความสามารถในการย่อยด้วยเอนไซม์ ยิ่งไปกว่านี้สิ่งที่น่าสนใจที่ทำให้

H_3PO_4 เหมาะสมก็คือกรดที่เหลือในสารผสมหนืด (slurry) ระหว่างฟางข้าวและกรดสามารถทำหน้าที่เป็นฟอสเฟตที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก และยังสามารถนำฟอสเฟตที่เหลือในไฮโดรไลเสตกลับมาใช้ใหม่และเป็นปุ๋ยเพื่อการเจริญเติบโตของพืช แม้ว่าการใช้ H_3PO_4 มีข้อจำกัดในเรื่องของต้นทุนอุตสาหกรรม โดยที่ราคาของ H_3PO_4 ที่ความบริสุทธิ์ 85% ($US 6-7.5/kg) สูงกว่า H_2SO_4 ที่ความบริสุทธิ์ 92.5% ($US 2-4/kg) แต่สิ่งที่เข้ามาทดแทนข้อเสียในเรื่องของต้นทุนคือข้อดีในการปรับสภาพชีวมวล (biomass) (Nair และคณะ, 2016) หากเราคำนึงถึงสิ่งหลังนี้ H_3PO_4 จึงถูกเลือกเป็นตัวเร่งในการทำปฏิกิริยาด้วยกรด (acid catalyst) ในการปรับสภาพฟางข้าวตลอดของการศึกษาชิ้นนี้



รูปที่ 3.3 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดต่าง ๆ ที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) โดยที่ A1-A3 (ไม่ผ่านการปรับสภาพ), B1-B3 (ปรับสภาพด้วย H_3PO_4), C1-C3 (ปรับสภาพด้วย H_2SO_4) และ D1-D3 (ปรับสภาพด้วย HCl)



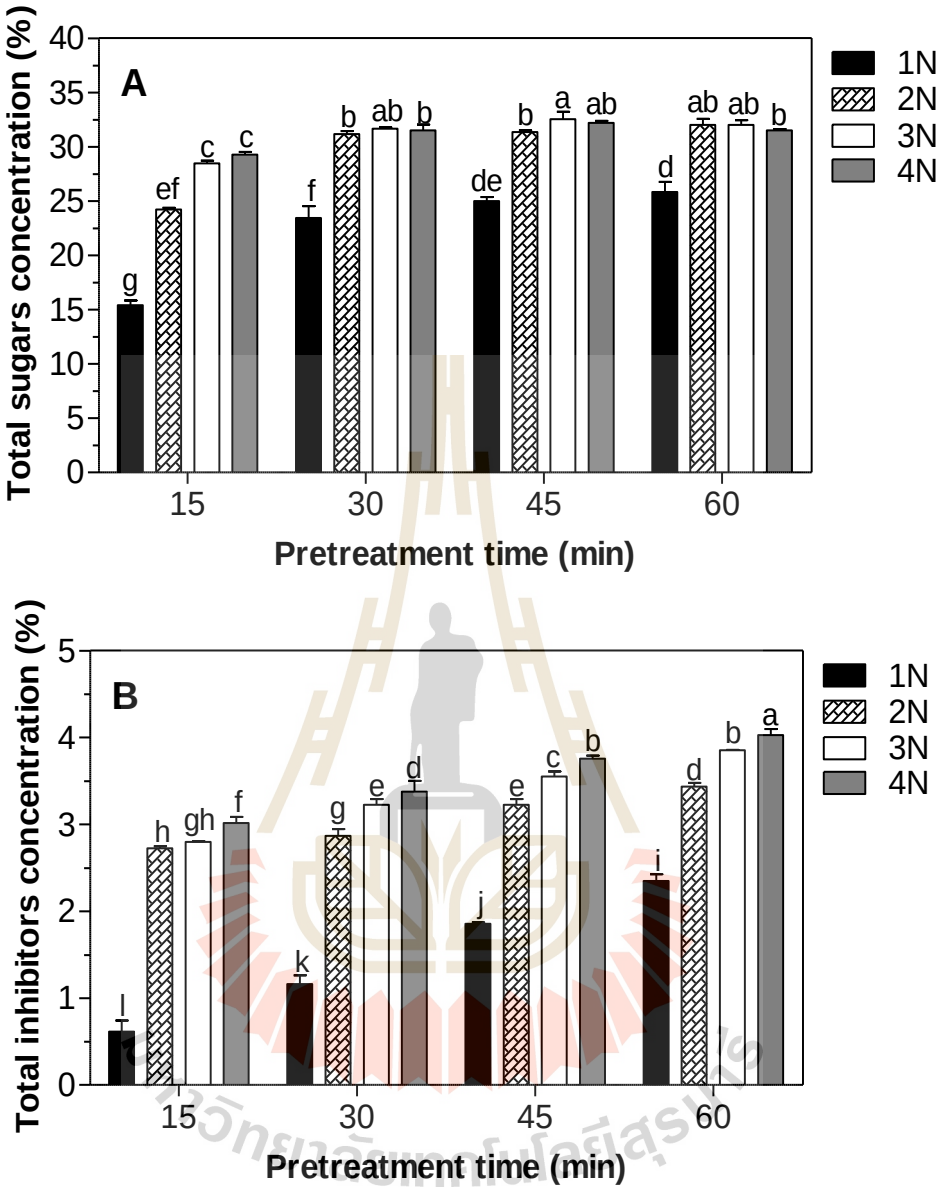
รูปที่ 3.4 แสดง X-ray diffraction diagram: XRD (A) และ FT-IR spectrum (B) ของฟางข้าวที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกมาแล้ว

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดฟอสฟอริก

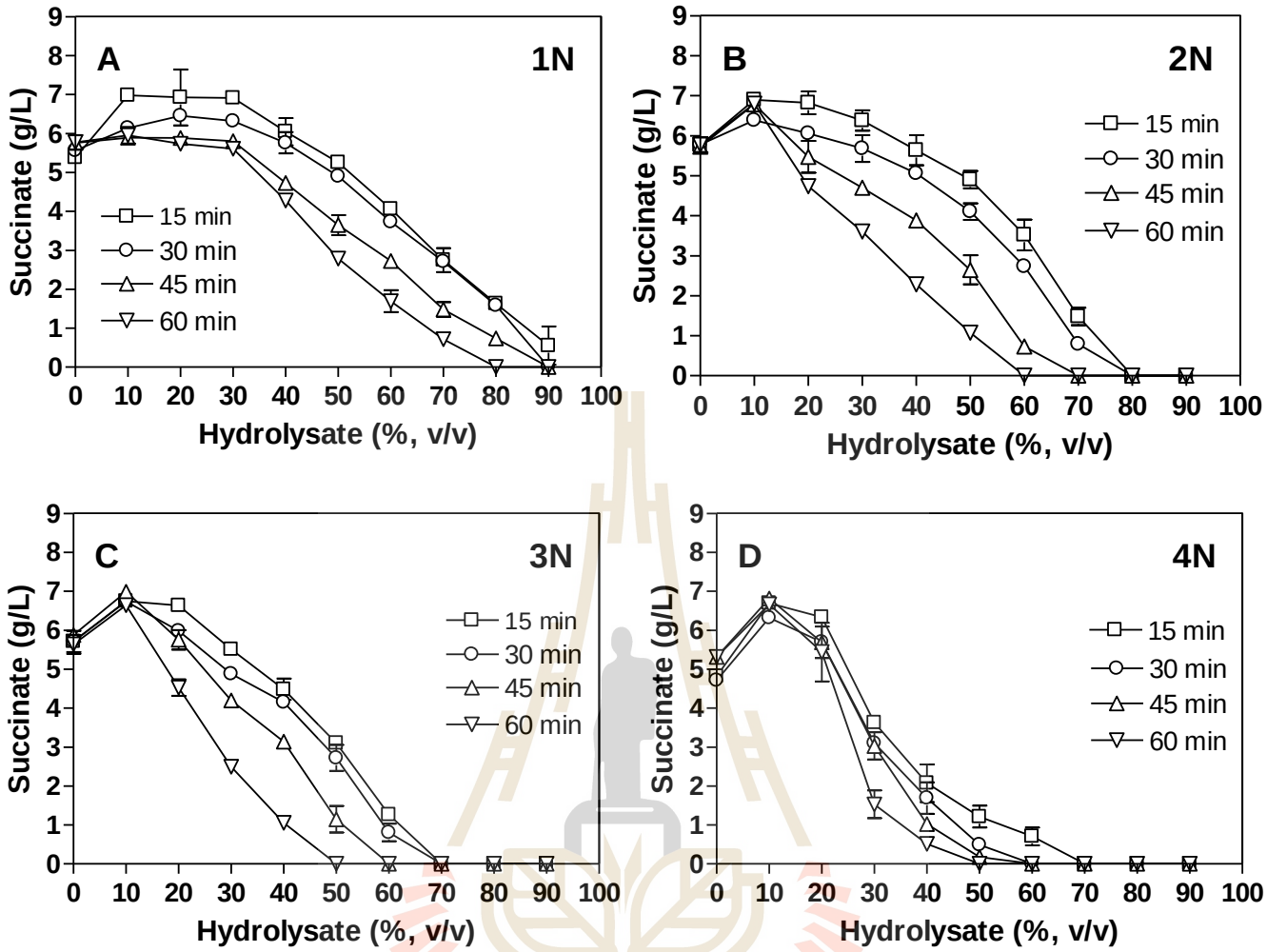
การปรับสภาพฟางข้าวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความเข้มข้นของ H_3PO_4 ที่เวลาแตกต่างกันถูกศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยน้ำตาลรวมและสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการปรับสภาพแสดงในภาพที่ 3.5 และตารางที่ 3.3 น้ำตาลรวมในไฮโดรไลเสตถูกปรับปรุงเมื่อความเข้มข้น H_3PO_4 และเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพเพิ่มขึ้น เมื่อลองปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ความเข้มข้น 3 N เป็นเวลา 45 นาที โดยพบว่าน้ำตาลรวม และ %HS yield สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 32.5±0.7 g/L และ 94.8±2.6% ตามลำดับ (ภาพที่ 3.5A) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ความเข้มข้น 2 N เป็นเวลา 30 นาที (ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ได้คือ 31.2±0.3 g/L และเปอร์เซ็นต์ของ HS คือ 94.0±0.6%) และเป็นที่น่าสนใจว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ H_3PO_4 จาก 1 เป็น 2 N ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรวมพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของสารยับยั้งเล็กน้อยในส่วนของเหลวไฮโดรไลเสต อย่างไรก็ตามปริมาณ H^+ ที่เกินแสดงถึงความเข้มข้นของ H_3PO_4 ที่สูง (มากกว่า 2 N) ระยะเวลาในการปรับสภาพที่มากกว่า 30 นาที ไม่ได้ปรับปรุงการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล แต่กลับพบว่าทำให้การย่อยสลายโพลีแซ็คคาไรด์มีสารยับยั้งมากกว่า ไม่ว่าจะเป็น furfural, HMF, กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติกโดยพบว่าค่าสูงสุดของสารยับยั้งทั้งหมดถูกสังเกตได้จากการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ที่ความเข้มข้น 4 N เป็นเวลา 60 นาที (ภาพที่ 3.5B) สิ่งนี้ดูเหมือนจะเป็นผลมาจากการย่อยของเฮมิเซลลูโลสที่ความเข้มข้นกรดที่สูง

de Vasconcelos และคณะ (2013) รายงานว่าการสลายของเฮมิเซลลูโลสของชานอ้อยที่ 98% ทำได้ที่ความเข้มข้น 0.2% ของ H_3PO_4 ที่อุณหภูมิ 186 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 นาที อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารยับยั้งรวมที่ 3.0±0.3% (w/w) ที่ได้จากการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ความเข้มข้น 2 N เป็นเวลา 30 นาที มีค่าต่ำกว่าอย่างมาก ในขณะที่น้ำตาลรวมที่ปล่อยออกมาจากของเหลวสามารถเปรียบเทียบทางสถิติได้ ($p<0.05$) โดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จาก HCl ความเข้มข้น 1 N (4.9±0.1%) และ H_2SO_4 1 N (4.4±0.1%) ภายใต้สภาวะการปรับสภาพแบบเดียวกัน Romero และคณะ (2007) กล่าวว่า H_3PO_4 มีความรุนแรงน้อยกว่า HCl และ H_2SO_4 ดังนั้นจึงมีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่ำที่สุด ภาพที่ 3.6 แสดงให้เห็นค่า MIC ของไฮโดรไลเสตที่เกิดจากการย่อยด้วย H_3PO_4 ต่อเชื้อ AS1600a ในระหว่างการผลิตซัคซิเนต ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในทิศทางเดียวกับสิ่งที่พบก่อนหน้านี้ในภาพที่ 3.1 ซึ่งระดับ MIC ที่ต่ำถูกสังเกตเมื่อใช้ไฮโดรไลเสตที่เตรียมไว้ใช้เวลาในการย่อยนาน รวมไปถึงความเข้มข้นของกรดที่ความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตามระดับ MIC ที่ 80% ได้รับจากการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 2 N เป็นเวลาทั้ง 15 และ 30 นาที แต่การปรับสภาพเป็นเวลา 15 นาที ยังผลให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรวมต่ำสุด จากผลการทดลองนี้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพฟางข้าวคือ H_3PO_4 ที่ความเข้มข้น 2 N พร้อมกับใช้ระยะเวลาเพียง 30 นาที การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการย่อยชานอ้อย (Gamez และคณะ, 2004) และชานข้าวฟ่างหวาน (Vazquez และคณะ, 2007) ถูกย่อยอย่างมีประสิทธิภาพในความเข้มข้นช่วง 2-6% ของ H_3PO_4 ที่อุณหภูมิ 100-122 องศาเซลเซียส Geddes และคณะ (2010) ยังรายงานด้วยการปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรด

ฟอสฟอริก 1% (w/w) ที่อุณหภูมิมากกว่า 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที มีประสิทธิภาพในการย่อยส่วนของเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวพร้อมกับปฏิกิริยาข้างเคียงเล็กน้อย



รูปที่ 3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพของฟางข้าวด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นและเวลาที่แตกต่างกัน (A) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยในสารละลายไฮโดรไลเสซ (B) ปริมาณสารยับยั้งที่ปลดปล่อยในสารละลายไฮโดรไลเสซ (บาร์แม่งที่มีตัวอักษรที่ต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนับสำคัญของปริมาณน้ำตาลที่ความเชื่อมั่น 95% $p<0.05$).



รูปที่ 3.6 แสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารละลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตซักซิเนตด้วย *E. coli* AS1600a ในหลอดทดลอง

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณน้ำตาลและสารยับยั้งที่เกิดขึ้นระหว่างการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน

H_3PO_4 conc. (M)	Pretreatment time (min)	Sugars conversion (%, w/w on dry basis)								Inhibitor conversion (%, w/w on dry basis)				
		Glucose	Xylose	Arabinose	Cellobiose	Galactose	Total sugars	%CS	%HS	Furfural	HMF	Formic acid	Acetic acid	Total inhibitors
1	15	3.2±0.16	8.0±0.1	2.2±0.1	1.4±0.1	0.1±0.0	15.4±0.4	11.7±0.6	43.2±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.1	0.6±0.1
	30	4.2±0.2	14.7±0.7	2.7±0.1	1.2±0.1	0.3±0.1	23.5±1.1	13.5±0.4	73.2±3.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.2±0.1	1.2±0.1
	45	4.6±0.3	15.7±0.1	2.8±0.1	1.1±0.1	0.3±0.0	25.0±0.4	14.4±0.6	78.1±0.7	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	1.4±0.1	1.9±0.0
	60	4.6±0.6	16.3±0.5	3.1±0.1	1.0±0.2	0.4±0.0	25.8±0.9	14.3±1.0	81.5±2.6	0.1±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1	1.5±0.	2.3±0.1
2	15	4.6±0.1	15.1±0.3	3.3±0.1	1.6±0.1	0.1±0.0	24.2±0.2	13.2±0.1	77.5±0.8	0.1±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	2.0±0.0	2.7±0.0
	30	6.8±0.1	18.7±0.2	3.6±0.1	1.2±0.1	0.5±0.1	31.2±0.3	20.1±0.5	94.0±0.6	0.1±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	2.2±0.2	3.0±0.3
	45	6.9±0.0	18.5±0.1	3.7±0.1	1.4±0.0	0.4±0.0	31.4±0.1	21.1±0.0	93.4±0.6	0.1±0.0	0.5±0.0	0.3±0.0	2.3±0.0	3.2±0.1
	60	7.4±0.1	18.7±0.3	3.6±0.2	1.4±0.1	0.5±0.0	32.0±0.6	22.2±0.6	94.1±1.6	0.2±0.0	0.6±0.0	0.3±0.0	2.4±0.1	3.4±0.0
3	15	5.6±0.0	17.4±0.4	3.4±0.0	1.3±0.2	0.3±0.0	28.5±0.3	17.4±0.5	87.8±1.9	0.1±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	2.1±0.0	2.8±0.0
	30	7.4±0.0	18.5±0.1	3.6±0.0	1.3±0.1	0.4±0.0	31.7±0.1	22.0±0.1	93.0±0.5	0.1±0.0	0.5±0.0	0.3±0.0	2.3±0.1	3.2±0.1
	45	8.1±0.1	18.6±0.5	3.9±0.2	1.1±0.1	0.5±0.0	32.5±0.7	23.2±0.1	94.8±2.6	0.2±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	2.4±0.1	3.6±0.1
	60	7.8±0.2	18.2±0.4	3.9±0.2	1.2±0.1	0.5±0.1	32.0±0.4	22.8±0.1	93.1±1.6	0.2±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	2.5±0.1	3.9±0.0
4	15	5.4±0.2	18.1±0.2	3.5±0.0	1.0±0.1	0.7±0.2	29.3±0.4	16.4±0.1	91.4±1.1	0.2±0.0	0.6±0.0	0.2±0.0	2.1±0.0	3.0±0.1
	30	6.9±0.1	18.5±0.5	3.8±0.1	1.3±0.1	0.5±0.0	31.5±0.9	20.8±0.6	94.1±2.7	0.2±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	2.3±0.1	3.4±0.1
	45	8.1±0.2	18.4±0.1	3.8±0.0	0.9±0.0	0.5±0.1	32.2±0.3	22.9±0.4	93.8±0.4	0.2±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	2.5±0.0	3.8±0.0
	60	8.1±0.0	17.8±0.3	3.6±0.2	1.0±0.2	0.5±0.1	31.5±0.2	23.0±0.5	90.6±0.4	0.2±0.0	0.8±0.0	0.5±0.0	2.6±0.1	4.0±0.1

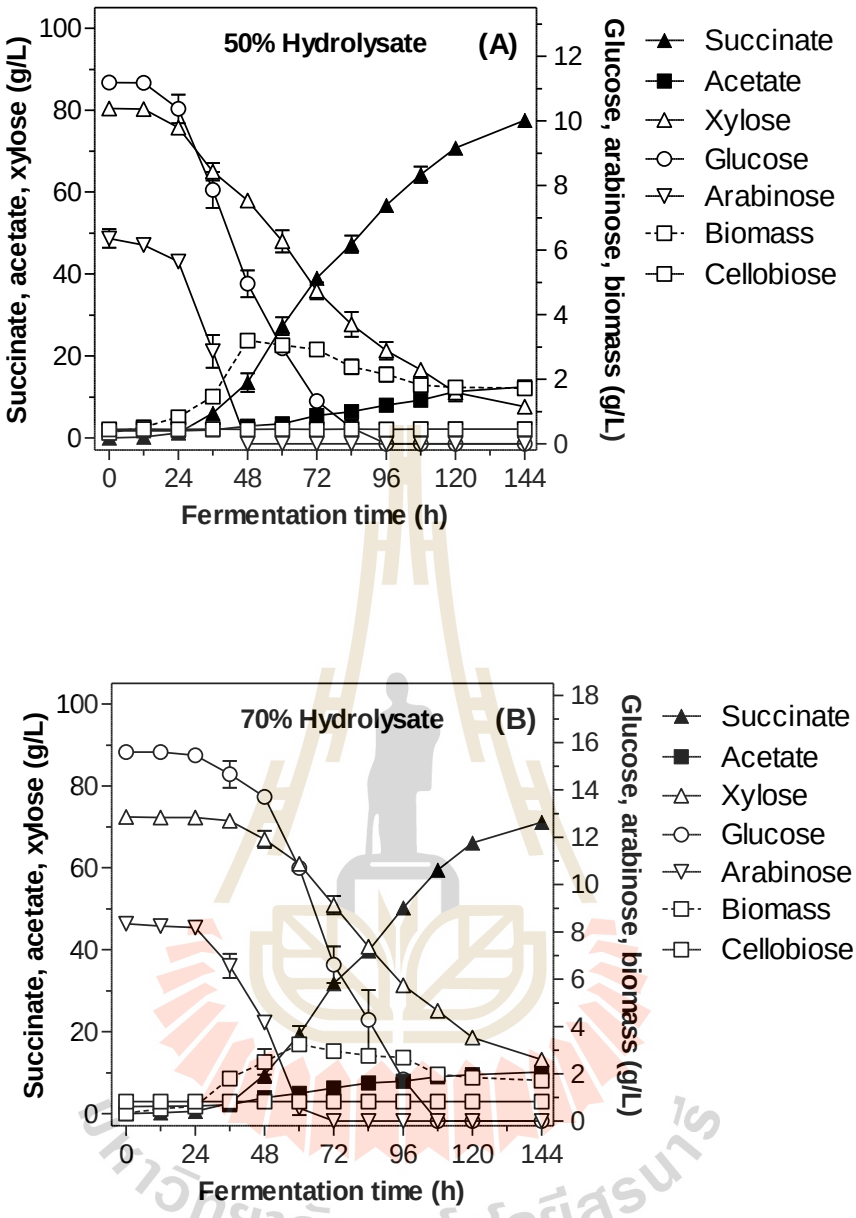
การผลิตซัคซิเนตจากฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก

การหมักไฮโดรไลเสตส่วนที่เป็นของเหลว

เนื่องจากน้ำตาลรวมในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วย 2 N H_3PO_4 มีประมาณเพียง 30 g/L จึงนำไฮโดรไลเสตไปทำการระเหยภายใต้สุญญากาศเพื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลในไฮโดรไลเสตเป็น 100 g/L ซึ่งเป็นระดับน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม หลังจากที่ทำการระเหยภายใต้สุญญากาศน้ำตาลรวมเพิ่มขึ้นจาก 31.3±0.3 g/L เป็น 102.1±0.1 g/L ในขณะที่ furfural ถูกกำจัดหลังจากทำการระเหย อย่างไรก็ตามสารประกอบที่เป็นพิษซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และ HMF เพิ่มขึ้นเล็กน้อย สารยับยั้งรวมในไฮโดรไลเสตหลังจากทำการระเหยเพิ่มขึ้นเป็น 4.3±0.1 g/L ซึ่งสูงกว่าไฮโดรไลเสตเดิมเพียงแค่ 1.4 เท่า

Chandel และคณะ (2013) รายงานว่าการระเหยภายใต้สุญญากาศอาจจะกำจัดสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น furfural, กรดอะซิติก และสารวานิลิน (vanillin) จากไฮโดรไลเสตเฮมิเซลลูโลส อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารยับยั้งรวมที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยมีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์อย่างมาก ดังนั้นจึงต้องทำการปรับสภาพเพื่อลดความเป็นพิษของสารยับยั้งโดยการปรับ pH ไฮโดรไลเสตให้เป็น 9 ด้วย NH_4OH (Geddes และคณะ, 2014) ในการศึกษาของเราพบว่าระดับ MIC ที่น้อยกว่า 50% (v/v) ถูกสังเกตได้สำหรับเชื้อสายพันธุ์ AS1600 ในระหว่างการผลิตซัคซิเนตและแม้ว่าไฮโดรไลเสตจะเติมด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) แล้วก็ตาม (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a สามารถเจริญและผลิตซัคซิเนตจากไฮโดรไลเสตของฟางข้าวที่ทำการระเหยแล้วที่ระดับ 50-70%(v/v) ในถังหมักที่ควบคุมอุณหภูมิ (ภาพที่ 3.7) และเป็นไปตามที่คาดการณ์เชื้อมีระยะ lag phase ยาวขึ้นเมื่อใช้ไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้นสูง หรือแม้ว่าจะมีกำจัดความเป็นพิษโดยปรับ pH เป็น 9.0 หรือเติมโซเดียมไบซัลไฟต์ด้วยแล้วก็ตาม ผลการทดลองยังพบว่าการใช้ไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้น 50% (v/v) เชื้อสายพันธุ์ AS1600a เริ่มการผลิตซัคซิเนตหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.7A) ในขณะที่ซัคซิเนตถูกผลิตหลังจากเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง เมื่อใช้ไฮโดรไลเสต 70% (v/v) (ภาพที่ 3.7B) สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งซึ่งมีในไฮโดรไลเสตของฟางข้าวมีปริมาณเพียงพอที่ชะลอการเจริญของ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a อย่างไรก็ตามหลังจากหมักไป 6 วัน ความเข้มข้นของซัคซิเนตของ 78.5±0.1 g/L และ 71.6±0.3 g/L โดยมีผลผลิตที่สามารถเปรียบเทียบได้ที่ 0.86 g/g ซึ่งได้รับจากไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้น 50% และ 70% ตามลำดับ ไม่เพียงเท่านั้นการเจริญของเชื้อที่ช้าส่งผลให้อัตราการผลิตลดลง ยังผลทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตทั้งหมดลดลง Avci และคณะ (2013) พบว่าการมีสารยับยั้งกรดฟอสฟอริกในไฮโดรไลเสตจากซังข้าวโพดเป็นผลให้ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ FBR5 ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลมีการเจริญในช่วง lag ที่ยาวนาน ในช่วงก่อนการหมัก



รูปที่ 3.7 แสดงการผลิตซักซิเนตด้วย *E. coli* AS1600a สารละลายไฮโดนไลเซสของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ในถังหมักขนาด 2L fermenter ภายใต้กระบวนการหมักแบบ SSF process. (A) 50% (v/v) (B) 70% (v/v) ไฮโดรไลเซส.

เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อสายพันธุ์ AS1600a สามารถใช้กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนสในไฮโดรไลเสตได้พร้อมกันโดยที่ไม่เกิด carbon catabolite repression (CCR) เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถใช้กลูโคสและอะราบิโนสอย่างสมบูรณ์ ยกเว้นไซโลสที่เหลือประมาณ 10 g/L ถึงแม้ว่าจะเพิ่มเวลาในการหมักถึง 6 วัน มีการรายงานว่าการขนส่งกลูโคสไปยังเซลล์ *E. coli* เกิดขึ้นผ่านระบบ phosphotransferase (phosphotransferase system; PTS) ซึ่งมักจะถูกควบคุมโดย CCR (Deutscher และคณะ, 2006) สำหรับไซโลสและอะราบิโนสจะมี

การนำเข้าสู่เซลล์ที่แตกต่างจากกลูโคส โดยน้ำตาลสองชนิดหลังนี้มักจะถูกนำเข้าไปยัง *E. coli* สายพันธุ์ปกติ (wild type *E. coli*) ผ่านตัวโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์คือ xylose-ABC transporter และ arabinose: H^+ symporter ตามลำดับ ซึ่งระดับการแสดงออกในการทำงานของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งน้ำตาลสองอย่างหลังนี้ถูกควบคุมด้วยกลไก CCR (Khunnonkawo และคณะ, 2018) Zhang และคณะ, (2009) เปิดเผยข้อมูลว่า เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการพัฒนาเป็นสายพันธุ์ AS1600a นำกลูโคสเข้าผ่าน glucose permease (sugar-H^+ syporter GalP) แทนที่ระบบ PTS ตามธรรมชาติ Sawisit และคณะ (2015) ยังรายงานด้วยว่า เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a เกิดการกลายพันธุ์แบบ single mutation ใน galactose permease โดยพบว่า GalP ที่กลายพันธุ์ไปทำให้กรดอะมิโน glycine ที่ตำแหน่ง 236 เปลี่ยนไปเป็น aspartic acid การกลายพันธุ์นี้ทำให้เชื้อที่พัฒนาขึ้นมาใหม่มีการนำเข้าทั้งกลูโคสและไซโลสโดยใช้โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (transporter) ตัวเดียวกันโดยที่ไม่มีความกังวลในเรื่องของผลกระทบจากการควบคุมของ CCR ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์ AS1600a อาจจะสร้าง ATP อย่างมีประสิทธิภาพจากกระบวนการ glycolysis และสงวนไว้กับกระบวนการเมทาบอลิซึมของไซโลส (xylose metabolism) ผ่านวิถี pentose phosphate (PP) ในระหว่างการผลิตซัคซิเนต อย่างไรก็ตามพบว่า เชื้อสายพันธุ์ AS1600a ไม่สามารถใช้เซลโลไบโอสได้เลยตลอดช่วงเวลาในการหมัก (ภาพที่ 3.7) โดยที่ Vinuselvi and Lee (2011) แนะนำว่าเชื้อ *E. coli* ไม่สามารถใช้เซลโลไบโอสได้เนื่องจากมันมียีนที่หลบซ่อน (cryptic genes) ซึ่งก็คือ *ascFB* (ยีนที่เกี่ยวข้องกับ phosphotransferase system II และ a phosphor-β-glucosidase ตามลำดับ) และ *chb* (chitobiose/cellobiose-PTS permease) ยกเว้นว่ามีการทำให้เกิดสภาวะกดดันเพื่อการอยู่รอดอาจจะทำให้เชื้อสามารถใช้เซลโลไบโอสได้

การหมักส่วนของแข็งเซลลูโลส

เชื้อสายพันธุ์ AS1600a มีความสามารถในการใช้น้ำตาลที่ได้จากส่วนของแข็งของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว และสามารถผลิตซัคซิเนตได้โดยไม่มีระยะ lag phase ในกระบวนการ SSF (ภาพที่ 3.8A-B) โดยพบว่าเมื่อใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพในสัดส่วน 70 g/L เชื้อสายพันธุ์ AS1600a สามารถผลิตซัคซิเนตได้ภายใน 12 ชั่วโมงแรก ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่ปล่อยออกมามีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสได้พร้อม ๆ กันภายในเวลา 120 ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าความเข้มข้นของซัคซิเนตมีค่าเท่ากับ 47.3±0.1 g/L คิดเป็นผลผลิตที่ 0.87 g/g และหากใช้ฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้วในส่วนที่เป็นของแข็งเป็นสารตั้งต้นในอัตราส่วน 100 g/L ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่ปล่อยออกกลับมีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 และพบว่าไซโลสถูกใช้หมดไปภายใน 108 ชั่วโมง ในขณะที่เหลือกลูโคสปริมาณ 4 g/L และถึงแม้เวลาในการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 144 ชั่วโมง ก็ไม่พบว่ากลูโคสถูกใช้เพิ่ม ความเข้มข้นของซัคซิเนตในสภาวะหลังนี้มีความเข้มข้นที่ 63.8±0.2 g/L คิดผลผลิตตเป็น 0.86 g/g อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการผลิตซัคซิเนตที่เทียบกับเวลาของความเข้มข้นฟางข้างที่ 100 g/L มีค่าต่ำกว่าการใช้ฟาง

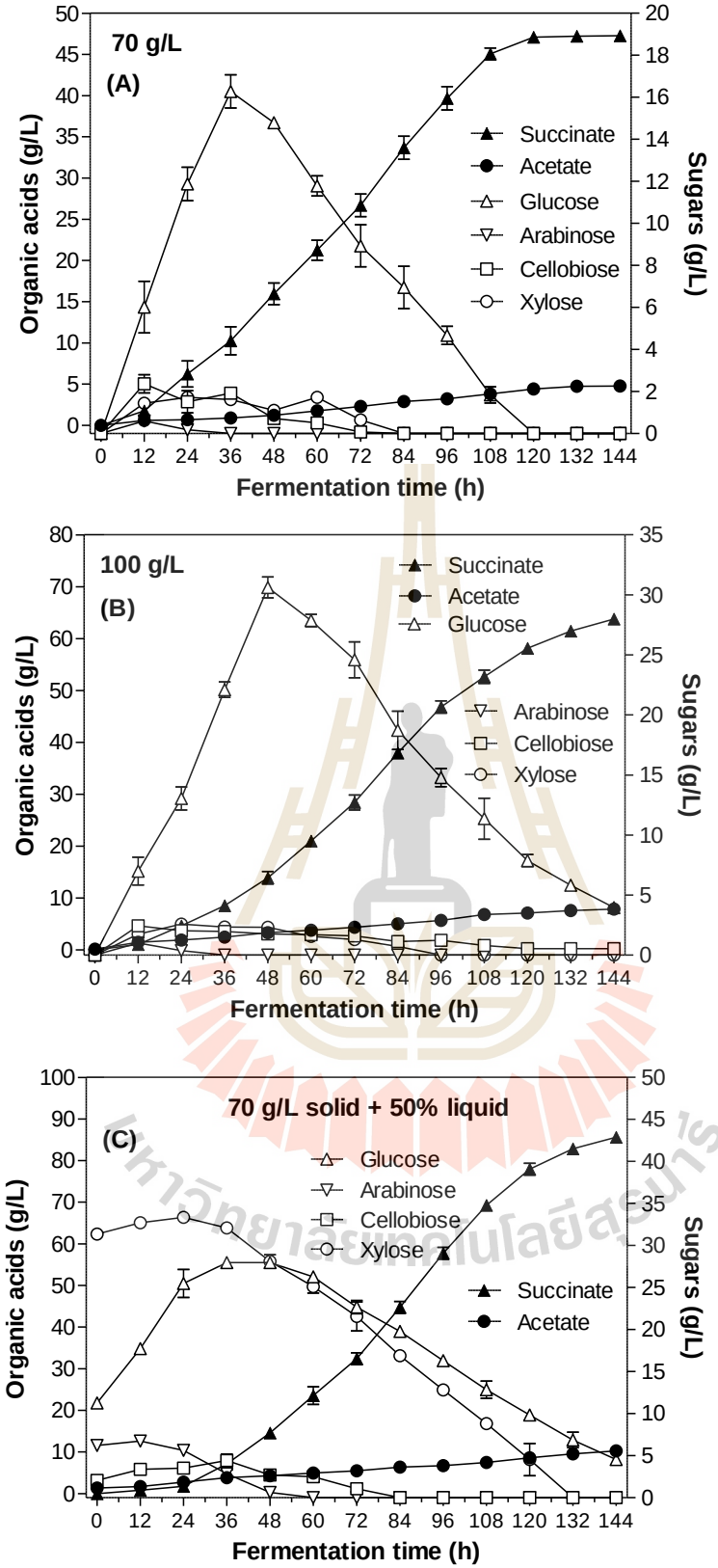
ข้าวที่ความเข้มข้น 70 g/L สิ่งนี้อาจจะสะท้อนให้เห็นถึงการชะลอการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ AS1600a เมื่อใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพแล้วที่ 100 g/L ปริมาณของแข็งที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดมากขึ้นและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการกวน ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิดการลดลงของประสิทธิภาพในการถ่ายเทความร้อน (heat transfer) และการเคลื่อนย้ายของมวล (mass transfer) ในสภาวะที่มีของแข็งมากขึ้น Chu-Ky และคณะ (2016) ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความหนืดของอาหารที่ใช้ในการหมักอาจจะลดอัตราการชักซิเนตระหว่างกระบวนการหมัก อันเนื่องมาจากมันลดโอกาสการทำให้เชื้อและสารตั้งต้นเผชิญหน้าเข้าหากัน ผลในลักษณะเดียวกันนี้ยังถูกสังเกตในการศึกษาของ Sawisit และคณะ (2015b) ซึ่งพบว่าการใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 g/L ในการหมักซัคซิเนตแบบ SSF batch โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ทำให้ลดการใช้กลูโคส ลดประสิทธิภาพในการหมักและการผลิตซัคซิเนต อันเนื่องจากความยากในการกวน

การหมักส่วนที่เป็นของแข็งเซลลูโลส (S) และของเหลวไฮโดรไลเสต (L)

การใช้ทั้งส่วนที่เป็นของเหลวไฮโดรไลเสตเฮมิเซลลูโลสและส่วนที่เป็นของแข็งเซลลูโลสจากมวลชีวภาพ (biomass) ที่ทำการปรับสภาพแล้วน่าจะเป็นประโยชน์ต่อความเป็นไปได้ในการผลิตซัคซิเนตจากการหมัก ขั้นตอนของการรวมไฮโดรไลเสตเหลวและของแข็งเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบ LS+SSF ถูกพัฒนาเพื่อการผลิตซัคซิเนตโดยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a ในการทดลองนี้ได้ประเมินการหมักซัคซิเนตแบบกะ LS+SSF ที่มีการใช้ทั้งส่วนของเหลวไฮโดรไลเสต 50% (v/v) และส่วนที่เป็นของแข็งฟางข้าวซึ่งทำการปรับสภาพแล้ว 70 g/L เป็นสารตั้งต้นและทำการหมักด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a ในถังหมักที่ควบคุมที่สามารถควบคุม pH ได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ AS1600a เริ่มการผลิตซัคซิเนตหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยที่ส่วนที่เป็นของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพของฟางข้าวถูกย่อยทันทีหลังจากเติมเอนไซม์เข้าไปในถังหมัก (ภาพที่ 3.8C) ไซโลสและกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างชั่วโมงที่ 24 และ 36 ตามลำดับ ก่อนที่จะลดลง อย่างไรก็ตามทั้งไซโลสและอะราบิโนสถูกใช้อย่างสมบูรณ์โดยเชื้อสายพันธุ์นี้ ในขณะที่เหลือกลูโคสอีกจำนวนเล็กน้อย (4.6±0.7) ซึ่งไม่ได้ถูกใช้ไปหลังจากหมักวันที่ 6 (144 ชั่วโมง) ที่สิ้นสุดของการหมัก โดยพบว่าความเข้มข้นของซัคซิเนตมีค่าอยู่ที่ 85.6±0.1 g/L พร้อมกับมีค่าผลผลิต และอัตราการผลิตสูงขึ้นเป็น 0.9 g/g ของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพแล้ว และ 0.6 g/L/h ตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจว่าขั้นตอนการหมักครั้งเดียวด้วยกระบวนการหมักแบบกะ LS+SSF ช่วยปรับปรุงความเข้มข้นของซัคซิเนตประมาณ 9% และ 34% เมื่อเปรียบกับ SHF (78.5 ±0.1 g/L) และกระบวนการแบบ SSF (63.8 ±0.2 g/L) ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นในเรื่องของ yield ความเข้มข้น และ productivity ของซัคซิเนต เนื่องจากกระบวนการหมักแบบ LS+SSF อาจจะ

จัดการกับปัญหาการกวนเมื่อใส่จำนวนของแข็งเยอะเกินไป โดยการเติมไฮโดรไลเสตของเหลว ในขณะที่ส่วนประกอบที่เป็นของแข็งสามารถเจือจางสารยับยั้งที่เป็นพิษในของเหลว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการหมักแบบ LS+SSF เป็นวิธีที่น่าสนใจในการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก เมื่อเปรียบเทียบกับผลแบบเดียวกันในระหว่างกระบวนการ SHF และกระบวนการ SSF และเมื่อเปรียบเทียบกับงานที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ การผลิตซัคซิเนตโดยเชื้อสายพันธุ์ AS1600a จากฟางข้าวที่มีการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกในงานศึกษาชนิดนี้มีความเข้มข้นของซัคซิเนตที่สูงที่สุดในระหว่างกระบวนการทั้ง SHF หรือ SSF อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการผลิตหรือความเข้มข้นที่ได้เทียบได้กับหน่วยเวลาที่ได้รับจากการศึกษาชิ้นนี้คือ 0.6 g/L/h ซึ่งค่อนข้างต่ำ Zheng และคณะ (2009) แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของซัคซิเนตที่ผลิตได้จากไฮโดรไลเสตของฟางข้าวโพดมีความเข้มข้นสูงสุดที่ 45 g/L พร้อมกับผลผลิตคือ 0.81 g/g ที่อัตราการผลิตคือ 0.95 g/L/h ซึ่งหมักโดย *A. succinogenes* CGMCC1593 ในขณะที่ Liang และคณะ (2013) รายงานว่าความเข้มข้นของซัคซิเนตที่ผลิตจากไฮโดรไลเสตของชานอ้อย มีอัตราการผลิตสูงสุดที่ 2.73 g/L/h พร้อมกับผลผลิตคือ 0.87 g/g โดยที่ในเวลา 36 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตคือ 0.95 g/L/h ซึ่งหมักโดยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BA305 อีกทั้ง Shen และคณะ (2016) สามารถผลิตซัคซิเนตจากแหน และใช้เชื้อ *A. succinogenes* GXAS137 ในการหมัก โดยมีความเข้มข้นของซัคซิเนตอยู่ที่ 57.9 g/L และคิดเป็นความเข้มข้นต่อหน่วยเวลาคือ 1.3 g/L/h อย่างไรก็ตามการผลิตซัคซิเนตจากการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นการใช้อาหารที่เติมสารอาหารซับซ้อน (complex media) ในการหมัก ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มต้นทุนของอาหารและกระบวนการได้กลับมาของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับงานก่อนหน้านี้กระบวนการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทีความเข้มข้นเกลือต่ำหรือ low salt medium ภายใต้การหมักแบบกะ LS+SSF และไม่ใช้อากาศ การเจริญและการผลิตซัคซิเนตเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันเพียงขั้นตอนเดียว และการใช้อาหารแบบความเข้มข้นเกลือต่ำนี้สามารถลดต้นทุนในขั้นตอนการผลิตและการทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการบริสุทธิ์

Sawisit และคณะ (2018) เสนอถึงความสมดุลมวลทั้งหมด (mass balance) สำหรับการเปลี่ยนฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วย NaOH ไปเป็นซัคซิเนตอยู่ที่ประมาณ 494.8 g จากฟางข้าวสดที่มีน้ำหนัก 1 kg จากการวิเคราะห์ที่คล้ายกันสามารถเปรียบเทียบได้กับกระบวนการหมักแบบ LS+SSF ทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลประมาณ 694 g (308 g ในส่วนของเหลว และ 386 g ในส่วนของแข็ง) โดยที่ผลผลิตเท่ากับ 0.90 g/g ของฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วย H_3PO_4 และเมื่อทำการคำนวณเทียบกับการใช้ฟางข้าวเริ่มต้นพบว่ากรดซักซินิกความเข้มข้น 624 g พร้อมกับผลผลิตที่ 0.62 g/g ได้ถูกประมาณการไว้ ซึ่งเป็นการเพิ่มการผลิตซัคซิเนตถึง 26% เมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ทำการปรับสภาพด้วย NaOH



รูปที่ 3.8 แสดงการผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวจากส่วนที่เป็นของแข็งเซลลูโลส 70 g/L (A), 100 g/L (B), และ แบบ LS+SSF (70 g/L solid fraction และ 50% (v/v) hydrolysate liquor (C) ด้วย *E. coli* AS1600a ในถังหมักขนาด 2 L

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย

การศึกษาชิ้นนี้เป็นการศึกษาการใช้ฟางข้าวทำการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก โดยแสดงให้เห็นว่าฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมีประสิทธิภาพในการผลิตซัคซิเนตโดยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AS1600a พร้อมกับใช้ทั้งส่วนของเหลวและของแข็งในกระบวนการ SSF ซัคซิเนตถูกผลิตออกมาด้วยความเข้มข้นและ yield ที่น่าประทับใจและอย่างชื่นชอบ เมื่อเปรียบเทียบกับงานก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 4.1) กระบวนการทดลองถูกศึกษาโดยใช้อาหารที่มีต้นทุนต่ำภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนอย่างง่าย กระบวนการนี้จึงดูเหมือนจะเป็นวิธีการที่น่าสนใจและเป็นไปได้ที่จะใช้ทั้งส่วนของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วย H_3PO_4 ในการผลิตซัคซิเนต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตกรดซักซินิกด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลสหลายชนิด

Biomass	Microorganism	Media/condition	Fermentation mode	Succinate (g/L)	Yield (g/100 g substrate)	References
Corn straw	*A. succinogenes* CGMCC1593	Complex medium supplemented with 20 g/L corn steep liquor, pH maintained with 40 g/L $MgCO_3$.	Batch SHF	45.5	80.7	Zheng et al. (2009)
Corn stover	*A. succinogenes* CGMCC1593	Complex medium supplemented with 20 g/L corn steep liquor, pH maintained with 40 g/L $MgCO_3$.	Batch SSF	47.4	72	Zheng et al. (2010)
Sugarcane bagasse	*A. succinogenes* CIP 106512	Complex medium supplemented with 2 g/L yeast extract, 10 g/L $NaHCO_3$, CO_2 gas sparging at 0.05 vvm, pH maintained with 1 M NaOH.	Batch SHF	22.5	43	Borges and Pereira (2011)
Sugarcane bagasse	*E. coli* BA305	LB medium supplemented with chemically defined medium, three repetitive fermentation	Batch SHF	83	87	Liang et al. (2013)
Corn stalk	*E. coli* DC115	LB medium supplemented with chemically defined medium, simple bath fermentation	Batch SHF	21.1	76	Jiang et al. (2014)
Cassava pulp	*E. coli* KJ122	A low salt medium (AM1 4 g/L), pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3.	Batch SSF	80.9	85	Sawisit et al. (2015a)
Sugarcane bagasse	*E. coli* AS1600a	A low salt medium (AM1 4 g/L), pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3.	Batch SHF	77.0	88	Sawisit et al. (2015b)
Duckweed	*A. succinogenes* GXAS137	Complex medium supplemented with 14 g/L corn steep liquor powder, CO_2 gas sparging at 0.3 L/min, pH maintained with $MgCO_3$.	Batch SHF	57.9	89.8	Shen et al. (2016)
Arundo donax	*A. succiniciproducens* BPP7	Standard MH medium supplement with 5 g/L yeast extract, CO_2 gas sparging at 0.5 vvm, pH maintained with NH_4OH.	Batch SHF	9.4	84	Ventorino et al. (2017)
Rice straw	*E. coli* AS1600a	A low salt medium (AM1 4 g/L), pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3.	Batch SHF	78.5	86	This study
			Batch SSF	63.8	87	
			Batch LS+SSF	85.6	90	

บรรณานุกรม

1. AOAC (1990) Official methods of analysis, 15th edn. Association of official Analytical Chemists, Washington.
2. Bevilaqua, D.B., Montipo, S., Pedroso, G.B., Martins, A.F. 2015. Sustainable succinic acid production from rice husks. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 1, 9-13.
3. Chen, C., Ding, S., Wang, D., Li, Z., Ye, Q. 2014. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava to succinic acid by *Escherichia coli* NZN111. Bioresour. Technol. 163, 100-105.
4. Chen, K., Zhang, H., Miao, Y., Wei, P., Chen, J. 2011. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rapeseed meal for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. Enzyme Microb. Technol. 48, 339-344.
5. Chen, P., Tao, S., Zheng, P. 2016. Efficient and repeated production of succinic acid by turning sugarcane bagasse into sugar and support. Bioresour. Technol. 211, 406-413.
6. Chen, Y., Stevens, M.A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H. 2013. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. Biotechnol. Biofuels. 6, 8.
7. Cheng, Y.S., Zheng, Y., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S. 2010. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 1768-1784.
8. Fu, L., Gao, X., Yang, Y., Aiyong, F., Hao, H., Gao, C. 2014. Preparation of succinic acid using bipolar membrane electrodialysis. Sep. Purif. Technol. 127, 212-218.
9. Hsu, T.C., Guo, G.L., Chen, W.H., Hwang, W.S. 2010. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. Bioresource. Technol. 101, 4907-4913.
10. Jantama, K., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., Svoronos, S.A., Ingram, L.O. 2008. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. Biotechnol. Bioeng. 101, 881–893.
11. Khairudin, N.B.A., Mazlan, N.S.F. 2013. Molecular docking study of beta-glucosidase with cellobiose, cellotetraose and cellotetriose. Bioinformation. 9, 813-817.
12. Khor, K., Sawisit, A., Chan, S., Kanchanatawee, S., Jantama, S.S., Jantama, K. 2016. High production yield and specific productivity of succinate from cassava starch by

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

metabolically-engineered *Escherichia coli* KJ122. J. Chem. Technol. Biotechnol. 91, 2834–2841.

13. Khunnonkwao, P., Jantama, S.S., Kanchanatawee, S., Jantama, K. 2018. Re-engineering *Escherichia coli* KJ122 to enhance the utilization of xylose and xylose/glucose mixture for efficient succinate production in mineral salt medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 127-141.
14. Kim, I., Han, J.I. 2012. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. Biomass Bioenergy. 46, 210-217.
15. Kim, S.B., Lee, S.J., Lee, J.H., Jung, Y.R., Thapa, L.P., Kim, J.S., Um, Y., Park, C., Kim, S.W. 2013. Pretreatment of rice straw with combined process using dilute sulfuric acid and aqueous ammonia. Biotechnol. Biofuels. 6, 109.
16. Kim, T.H., Lee, Y.Y. 2007. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. Appl. Biochem. Biotechnol. 137, 81-92.
17. Krishnan, C., Sousa, C., Jin, M., Chang, L., Dale, B.E., Balan, V. 2010. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. Biotechnol. Bioeng. 107, 441–450.
18. Kumar, R., Wyman, C.E. 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. Bioresour. Technol. 100, 4203-4213.
19. Lee, C., Zheng, Y., Vander Gheynst, J.S. 2015. Effects of pretreatment conditions and post-pretreatment washing on ethanol production from dilute acid pretreated rice straw. Biosyst. Eng. 137, 36-42.
20. Li, Q., Lei, J., Zhang, R., Li, J., Xing, J. Gao, F., Gong, F., Yan, X. F., Wang, D., Su, Z., Ma, G. 2013. Efficient decolorization and deproteinization using uniform polymer microspheres in the succinic acid biorefinery from bio-waste cotton (*Gossypium hirsutum* L.) stalks. Bioresour. Technol. 135, 604–609.
21. Liang, L., Liu, R., Li, F., Wu, M., Chen, K., Ma, J., Jiang, M., Wei, P., Ouyang, P. 2013. Repetitive succinic acid production from lignocellulose hydrolysates by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. Bioresour. Technol. 143, 405-412.

22. Liu, C., Wyman, C.E. 2005. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. Bioresour. Technol. 96, 1978-1985.
23. Low, J.C., Halis, R., Shah, U.K.M., Paridah, M.T., Abood, F., Tuhaila, T., Danial, M.I., Lakarim, L., Razali, N. 2015. Enhancing enzymatic digestibility of Alkaline pretreated banana pseudostem for sugar production. BioResources. 10, 1930-2126.
24. Ma, H., Liu, W.W., Chen, X., Wu, Y.J., Yu, Z.L. 2009. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. Bioresour. Technol. 100, 1279-1284.
25. Martinez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. Biotechnol. Lett. 29, 397-404.
26. Rahnama, N., Mamat, S., MD Shah, U., Ling, F., Abdul Rahman, N., Ariff, A. 2013. Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and xylanase production by local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under solid state fermentation. BioResources. 2, 2881-2896.
27. Remli, N.A.M., Md Shah, U.K., Mohamad R, Abd. Aziz, S. 2014. Effects of chemical and thermal pretreatments on the enzymatic saccharification of rice straw for sugars production. BioResources. 1, 510-522.
28. Salvachua, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M.F.A., Nicol, W., Black, B.A., Biddy, M.J., Dowe, N., Beckham, G.T. 2016. Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. Biotechnol. for Biofuels. 9, 28.
29. Sawisit, A., Jantama, S.S., Kanchanatawee, S., Jantama, K. 2015. Efficient utilization of cassava pulp for succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* KJ122. Bioprocess Biosyst. Eng. 38, 175-187.
30. Shen, N., Wang, Q., Zhu, J., Qin, Y., Liao, S., Li, Y., Zhu, Q., Jin, Y., Du, L., Huang, R. 2016. Succinic acid production from duckweed (*Landoltia punctata*) hydrolysate by batch fermentation of *Actinobacillus succinogenes* GXAS137. Bioresour. Technol. 211, 307-312.
31. Silalertruksa, T., Gheewala, S.H. 2013. A comparative LCA of rice straw utilization for fuels and fertilizer in Thailand. Bioresour. Technol. 150, 412-419.

32. Swain, M.R., Krishnan, C. 2015. Improved conversion of rice straw to ethanol and xylitol by combination of moderate temperature ammonia pretreatment and sequential fermentation using *Candida tropicalis*. Ind. Crops Prod. 77, 1039-1046.
33. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.
34. Ventorino, V., Robertiello, A., Cimini, D., Argenzio, O., Schiraldi, C., Montella, S., Faraco, V., Ambrosanio, A., Viscardi, S., Pepe, O. 2017. Bio-based succinate production from *Arundo donax* hydrolysate with the new natural succinic acid-producing strain *Basfia succiniciproducens* BPP7. BioEnergy Research. 10, 488-498.
35. Wang, Z., Bay, H., Chew, K., Geng, A. 2014. High-loading oil palm empty fruit bunch saccharification using cellulases from *Trichoderma koningii* MF6. Process Biochem. 49, 673-680.
36. Weerasai, K., Suriyachai, N., Poonsrisawat, A., Arnthong, J., Unrean, P., Laosiripojana, N., Champreda, V. 2014. Sequential acid and alkaline pretreatment of rice straw for bioethanol fermentation. BioResources. 9, 5988-6001.
37. Weimer, P.J., Hackney, J.M., Jung, H.J.G., Hatfield, R.D. 2000. Fermentation of a bacterial cellulose/xylan composite by mixed ruminal microflora: Implications for the role of polysaccharide matrix Interactions in plant cell wall biodegradability. J. Agric. Food. Chem. 5, 1727–1733.
38. Yu, J., Li, Z., Ye, Q., Yang, Y., Chen, S. 2010. Development of succinic acid production from corncob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37, 1033-1040.
39. Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. 2009. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7807–7813.
40. Zhao, W., Peng, R., Xiong, A., Fu, X., Tian, Y., Yao, Q. 2012. Expression and characterization of a cold-active and xylose-stimulated beta-glucosidase from *Marinomonas* MWYL1 in *Escherichia coli*. Mol. Biol. Rep. 39, 2937-2943.
41. Zhao, Y., Wang, Y., Zhu, J.Y., Ragauskas, A., Deng, Y. 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. Biotechnol. Bioeng. 99, 1320-1328.

42. Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R. 2009a. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. Int. J. Agric. & Biol. Eng. 2, 51-68.
43. Zheng, P., Dong, J.J., Sun, Z.H., Ni, Y., Fang, L. 2009b. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresource. Technol. 100, 2425-2429.
44. Zheng, P., Fang, L., Xu, Y., Dong, J.J., Ni, Y., Sun, Z.H. 2010. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. Bioresour. Technol. 101, 7889-7894.

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ (ภาษาไทย)** นายเขมวิทย์ จันต๊ะมา

   (ภาษาอังกฤษ) Mr. KAEMWICH JANTAMA

   เลขหมายประจำตัวประชาชน 3501900644622

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

   รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

   สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

   สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ 044-22 4562; โทรสาร 044-22 4150, 044-22 4154 E-mail: kaemwich@sut.ac.th

4. **ประวัติการศึกษา**

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

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

   Metabolic Engineering and Evolution, Fermentation Technology, Molecular Genetics and Genetic Engineering, and Protein Expression

6. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น**

- **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : ชื่อแผนงานวิจัย
  - การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล และการแยกบริสุทธิ์ (วช. ปี 2555)
- **หัวหน้าโครงการวิจัย** :
  - วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* เพื่อผลิตกรดซักซินิกบริสุทธิ์ (มทส. ปี 2552-2553)
  - Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media (มทส. ปี 2552)
  - การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก (วช. ปี 2552)
  - การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย (สกว. ปี 2553-2554)
  - Production of Succinic Acid by Metabolic Engineered *E. coli* from Sucrose and Cane Molasses (International Foundation of Science ปี 2553)
  - การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกจากกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วช. ปี 2553)
  - การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ปี 2554)
  - การผลิตกรดแลคติคชนิด D-(-) จากแหล่งน้ำตาลอ้อยเข้มข้นกากน้ำตาล และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว โดยใช้ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (สวทช. ปี 2554)
  - การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเด็กซ์ทรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย ด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ (วช. ปี 2555)
  - การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเดรกซ์ตรินโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (วช. ปี 2555)
  - Fermentative Production of Succinate from Renewable Agricultural Products and Its Purification by Nano-Filtration Technology (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2556-2557)
  - การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122 (วช. ปี 2557-2558)
  - Optimization of 2,3-butanediol production from maltodextrin by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* KMS005 (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2558-2559)

- การประยุกต์ใช้เทคนิควิวัฒนาการเมทาบอลิกในเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีเมทาบอลิกสายพันธุ์ KJ122 เพื่อความทนทานต่อสารพิษในสารย่อยชานอ้อยและการผลิตกรดซักซินิกจากสารย่อยชานอ้อย (วช. ปี 2558-2559)
- การผลิต 2,3 บิวเทนไดออล (2,3-BD) จากไซโลสโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* KMS006 ที่ผ่านวิศวกรรมเมทาบอลิก (บ.พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด ปี 2559-2560)
- การผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ AS1600a (วช. ปี 2560-2561)
- การศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในน้ำผักและผลไม้ (วช. ปี 2560)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacullus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของเชื้อ *Escherichia coli* KJ122 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดซักซินิก (วช. ปี 2561)
- การเพิ่มมูลค่าของแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยการผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย *Klebsiella oxytoca* KMS005 (วช. ปี 2562)
- การพัฒนากล้าเชื้อโปรไบโอติกสำหรับ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่มีศักยภาพในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนมหมัก (คปก. ปี 2553-2557)
- การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากชานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซักซินิก (คปก. ปี 2554-2556)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของ *Escherichia coli* เพื่อการผลิต 3-HPA (คปก. ปี 2557-2561)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของ *Escherichia coli* เพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิก (คปก. ปี 2560-2564)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อการผลิตกรดซักซินิก (คปก. ปี 2561-2565)

○ **ผู้ร่วมโครงการวิจัย** :

- การแยก และทำให้บริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักโดยวิธีการสกัดแบบมีปฏิกิริยา (วช. ปี 2553)
- การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดยกระบวนการนาโนฟิวเตรชัน (วช. ปี 2553-2554)
- การแยกสาร 2,3-บิวเทนไดออลจากน้ำหมักโดยการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (วช. ปี 2555)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :**
  - วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* เพื่อผลิตกรดซักซินิกบริสุทธิ์ (มทส. ปี 2552-2553)
  - Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media (มทส. ปี 2552)
  - การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก (วช. ปี 2552)
  - การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย (สกว. ปี 2553-2554)
  - Production of Succinic Acid by Metabolic Engineered *E. coli* from Sucrose and Cane Molasses (International Foundation of Science ปี 2553)
  - การแยก และทำให้บริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักโดยวิธีการสกัดแบบมีปฏิกิริยา (วช. ปี 2553)
  - การแยกสาร 2,3-บิวเทนไดออลจากน้ำหมักโดยการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (วช. ปี 2555)
  - การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกจากกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วช. ปี 2553)
  - การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ปี 2554)
  - การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดยกระบวนการนาโนฟิวเตรชัน (วช. ปี 2553-2554)
  - การผลิตกรดแลคติคชนิด D-(-) จากแหล่งน้ำตาลอ้อยเข้มข้นกากน้ำตาล และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว โดยใช้ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (สวทช. ปี 2554)
  - การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเด็กซ์ทรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย ด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ (วช. ปี 2555)
  - การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเดรกซ์ตรินโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (วช. ปี 2555)
  - Fermentative Production of Succinate from Renewable Agricultural Products and Its Purification by Nano-Filtration Technology (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2556-2557)
  - การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122 (วช. ปี 2557-2558)

- Optimization of 2,3-butanediol production from maltodextrin by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* KMS005 (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2558-2559)
- การประยุกต์ใช้เทคนิควิวัฒนาการเมทาบอลิกในเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีเมทาบอลิกสายพันธุ์ KJ122 เพื่อความทนทานต่อสารพิษในสารย่อยชานอ้อยและการผลิตกรดซักซินิกจากสารย่อยชานอ้อย (วช. ปี 2558-2559)
- การผลิต 2,3 บิวเทนไดออล (2,3-BD) จากไซโลสโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* KMS006 ที่ผ่านวิศวกรรมเมทาบอลิก (บ.พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด ปี 2559-2560)
- การศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในน้ำผักและผลไม้ (วช. ปี 2560)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacullus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- การพัฒนากล้าเชื้อโปรไบโอติกสำหรับ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่มีศักยภาพในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนมหมัก (คปก. ปี 2553-2557)
- การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากชานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซักซินิก (คปก. ปี 2554-2556)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี