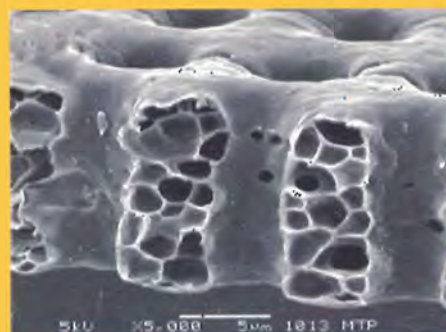
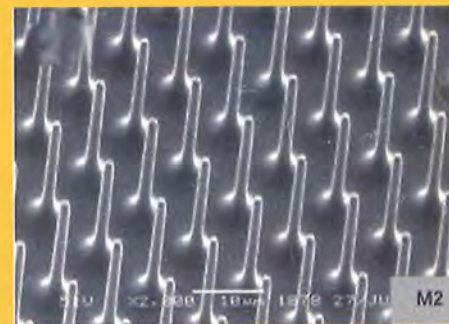
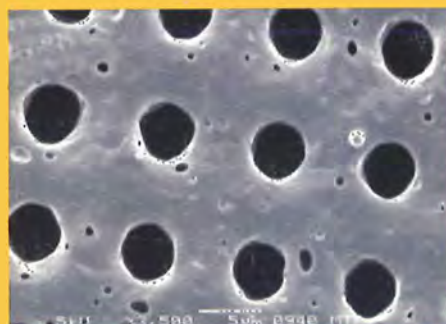
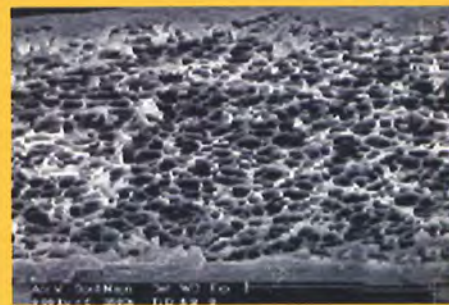
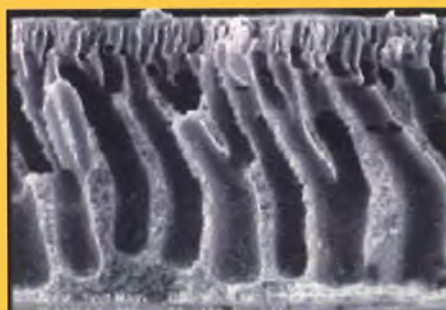






KKU SCIENCE JOURNAL



วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - ก.ย. 52) Vol. 37 No. 3 (Jul. - Sep. 05)

ISSN : 0125-2364

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ.เมือง จ.ขอนแก่น 400002

โทรศัพท์ 0-4320-2372 โทรสาร 0-4320-2371

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิทยาการในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานทางด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษา และผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก ปีละ 4 ฉบับ

- ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม
ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน
ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน
ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(เกียรติ แสงอรุณ)

บรรณาธิการ

สมปอง ธรรมศิริรักษ์

กองบรรณาธิการ

กิตติกร ศาสตรา	นาคประสิทธิ์ วงศ์ธนวิสุ
ชุติมา เอกพรรณ	หาญจวนิช สวัสดิ์ชิตัง
ศักดิ์ดา สมเดช	ดาควง กนกเมธากุล
สุพรรณิ งานนิจ	อิงปัญสดวงศ์ นนทโส
อัจฉราภรณ์	ภักดี

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิลิน สุชาติ	ดินนรเศรษฐ์ เทพภูเขียว
--------------	------------------------

ฝ่ายจัดการและ เลขานุการ

สุภาพร วุฒิฉัตร	พิมพ์วารี น้อยนรินทร์
วิญญูศักดิ์สิทธิ์	ลิ้มพลี สุวรรณ
พิบูล จิราภรณ์	ราชพลแสน พิมพ์ภูมิ

“ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงาน
คณะกรรมการการอุดมศึกษา”

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ



KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - ก.ย. 52) Vol. 37 No. 3 (Jul. - Sep. 09)

ISSN 0125 - 2364

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- ☐ แบคทีเรียโอซิน : สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย
Bacteriocins : Antimicrobial Substances
Produced by Bacteria
พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ..... 231
- ☐ วิถีชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์
ในแบคทีเรีย
Biosynthetic Pathways for Polyhydroxyal-
kanoate in Bacteria
ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล..... 244
- ☐ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์
จากจุลินทรีย์
Factors Affecting the Production of Microbial
Polyhydroxyalkanoate
ปิยะรัตน์ บุญแสง..... 256
- ☐ การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพพุลูลานและการ
ประยุกต์ใช้
Production of Pullulan Biopolymer and its
Applications
ลีหนาท ประสงค์สุข..... 268



KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - ก.ย. 52) Vol. 37 No. 3 (Jul. - Sep. 09)

ISSN 0125 - 2364

บทความ

- การเตรียมเยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์สังเคราะห์
Preparation of Synthetic Polymer Membranes
วชิรดา ชินผา..... 275

งานวิจัย

- การผลิตลิปิดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้
สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก
Lipid Production from the Green Microalgae
under Heterotrophic Cultivation
รัตนกรณ ลีสิงห์..... 284

- การแยกบริสุทธิ์โอวัลบูมินและไลโซไซม์
จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยการตกตะกอนด้วย
เอทานอลร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟี
Purification of Ovalbumin and Lysozyme
from Hen Egg White by Ethanol Precipitation
and Chromatography.
ธิปไตย ดิอันกอง พัฒนา เทศทับ
ศิริรัตน์ หลีกคำ ศักดา ดาตวง
สมปอง ธรรมศิริรักษ์..... 294

- ความหลากหลายของคลาโดเซราในนาข้าว
จังหวัดสงขลา
The Cladocera in Rice Fields in Songkhla
Province
Supiyant Maiphae
Phurichaya Janpriang..... 305

KKU SCIENCE JOURNAL



วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - ก.ย. 52) Vol. 37 No. 3 (Jul. - Sep. 09)

ISSN 0125 - 2364

งานวิจัย

- คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกระด้าง
Lentinus polychrous Lev.
Nutritive Value of Hed Kradang
(*Lentinus polychrous* Lev.)
จันทพร ทองเอกแก้ว..... 314
- Effect of Additive Substances and Planting
Substrate on Growth Development of
Aerides houlletiana Rchb. f. Seedling by
Tissue Culture
Somporn Prasertsongskun
Rosemina Awaesuemae..... 320
- ผลของเจลาตินและกรดซิตริกต่อคุณภาพทาง
ประสาทสัมผัสของกัมมีเยลลีสต๊ะไคร้
Effect of Gelatin and Citric Acid on Sensory
Quality of Lemongrass Flavored Gummy Jelly
เฉลิมพล ถนอมวงศ์..... 325
- ผลของการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้น
ต่อนิวเคลียสในกระเพาะหมักและการเจริญเติบโต
ในโคนมสาว
Effects of Supplementation of Yeast Fermented
Cassava Chip as a Replacement Concentrate
on Rumen Ecology and Growth in Heifer
สิทธิศักดิ์ คำผา สมมาศ อีรรัตน์
อุทัย โคตรตก กรุง วิลาชัย
ภูมิสิทธิ์ วรรณขารี เมธา วรรณพัฒน์... 333



KKU SCIENCE JOURNAL

KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - ก.ย. 52) Vol. 37 No. 3 (Jul. - Sep. 09)

ISSN 0125 - 2364

งานวิจัย

- ☐ Fixed Point Theorems and Convergence
for Mean Nonexpansive Mappings
Sukanya Somprom
Satit Saejung..... 342
- ☐ ความสัมพันธ์กรีนและความเป็นปกติของ
กึ่งกรุปการแปลงเต็มวงนัยทั่วไป
Green's Relations and Regularity of
Generalized Full Transformation
Semigroups
รณสรณ์ ชินรัมย์..... 348

มหาวิทยาลัยขอนแก่น



KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - มี.ค. 52) Vol. 37 No. 3 (Jul. - Sep. 09)

ISSN 0125 - 2364

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University. Khonkaen Thailand, 40002
Tel. 0-4320-2372 Fax 0-4320-2371

Objectives

1. To promote dissemination of knowledge
in all fields of science.
2. To publish research results of faculty,
researchers and students.
3. To be a medium for the exchange of
knowledge and ideas among faculty,
researchers and students of Khon Kaen
University and other institutions.

Publishing frequency

KKU Science Journal is a quarterly
journal. Each volume consists of 4 numbers.

Number 1 January - March

Number 2 April - June

Number 3 July - September

Number 4 October - December

Advisory Committee Dean, Faculty of Science
(Kiat Sangaroon)

Editor Sompong Thammasirirak

Editorial Board Kittikorn Nakpasit
Sartra Wongthanavas
Chutima Hanjavanit
Ekaphan Swatsitang
Sakda Daduang
Somdej Kanokmedhakul
Supunnee Ungpansattawong
Ngamnit Nontaso
Adcharaporn Pagdee

Artists Kilen Tinnoraset
Suchart Thepphukhieo

Managing Staff Suphaporn Phimwapi

and Secretary Vuttichat Noynarin
Wishanu Chimplee
Saksit Suwan
Phikun Ratphonsan
Jiraporn Pimphumee

“ With the Financial Support
of the Commission on
Higher Education ”

The views and opinions expressed in this journal are those of the author(s), and do not necessarily reflect the views and opinions of the editorial board.

บรรณานุกรม **แลกเปลี่ยน**

สวัสดิ์ค่ะ ท่านผู้อ่านที่เคารพรักทุกท่าน

พบกันอีกแล้วฉบับที่ 3 ของปี พ.ศ. 2552 พร้อมกับเนื้อหาทางวิชาการที่อัดแน่นเช่นเดิม ในเล่มจะมีบทความที่เกี่ยวข้องกับพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นทางเลือกใหม่ของพลาสติกในอนาคต เช่น วิธีชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรีย ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์ การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพพูลูลูแลนและการประยุกต์ใช้ การเตรียมเยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ นอกจากนี้ ยังมีบทความด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เช่น แบคทีเรียโอซิน : สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย การผลิตลิปิดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้สภาวะเฮโทรโทรฟิก ความหลากหลายชนิดของคลาโดเซราในนาข้าว จังหวัดสงขลา คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกระด้าง Effect of additive substances and planting substrate on growth development of *Aerides houlletiana* Rchb. f. seedling by tissue culture ผลของการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้นต้นในเห็ดวิทยาศาสตร์ในกระเพาะหมักและการเจริญเติบโตในโคนมสาว ผลของเจลดินและกรดซิตริก ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกัมมีเยลลีสระไคร้ และวารสารฉบับนี้ยังมีบทความทางคณิตศาสตร์อีกด้วย เช่น ความสัมพันธ์กรีนและความเป็นปกติของกึ่งการแปลงเต็มวงนัยทั่วไป Fixed point theorems and convergence for mean nonexpansive mappings เป็นต้น

ขอขอบคุณท่านผู้อ่านทุกท่าน แล้วพบกับฉบับสุดท้ายของปี 2552 ในเร็วๆ นี้ อย่าลืมติดตามนะคะ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สมปอง ชรรณศิริรักษ์

บรรณารักษ์วารสารวิทยาศาสตร์ มข.



แบคทีเรียโอซิน : สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

Bacteriocins : Antimicrobial Substances Produced by Bacteria

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุล โสภณ¹

บทคัดย่อ

แบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การศึกษาวิจัยแบคทีเรียโอซินได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในช่วงที่ผ่านมา เนื่องจากความสามารถในการยับยั้ง จุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย บทความนี้ได้รวบรวมผลงานวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับแบคทีเรียโอซิน ตั้งแต่เริ่มค้นพบแบคทีเรียโอซินชนิดแรกจนถึงปัจจุบัน และนำเสนอในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียโอซิน ดังนี้ ความหมาย การค้นพบ คุณสมบัติโดยทั่วไป การตั้งชื่อ กลไกการทำงาน การจำแนกชนิด รวมทั้งการนำไปใช้ ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและในทางการแพทย์

Abstract

Bacteriocins are antimicrobial proteins produced by bacteria. Recently, research on bacteriocins have become interesting because of their ability to inhibit growth of pathogenic and food-spoilage microorganisms. This review collected information obtained from studies of bacteriocins from the discovery of the first bacteriocin to present day. It described many aspects concerning bacteriocins including definition, discovery, general characteristics, nomenclature, mode of action, classification and uses in food industries and medicine.

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190

ความหมายของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซิน (bacteriocins) ถูกใช้ครั้งแรก โดย Jacob และคณะ ในปี ค.ศ. 1953 เพื่อใช้เรียก สารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน เช่น มี สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิต แบคทีเรียโอซิน หรือมีถิ่นที่อยู่ในบริเวณเดียวกันกับ แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน เป็นต้น

การค้นพบแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 โดย Gratia แบคทีเรียโอซินดังกล่าวผลิตโดย *Escherichia coli* V (หรือที่รู้จักในชื่อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ CA7) และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ϕ (หรือที่รู้จักในชื่อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ CA81) ด้วยเหตุที่แบคทีเรียโอซินดังกล่าวผลิต โดย *Escherichia coli* ดังนั้น จึงถูกให้ชื่อว่า colicin หลังจากที่มีการค้นพบ colicin ในครั้งแรกแล้ว ได้มี การค้นพบแบคทีเรียโอซินอีกหลายชนิดในเวลาต่อมา โดยแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่ผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria เช่น *Carnobacterium divergens* (Metivier et al., 2000), *Carnobacterium piscicola* (Jack et al., 1996), *Enterococcus faecalis* (Eguchi et al., 2001), *Lactobacillus acidophilus* (van der Vossen et al., 1994; Tahara and Kanatani, 1996; Oh et al., 2000), *Lactobacillus brevis* (Ogunbanwo et al., 2003), *Lactobacillus curvatus* (Casla et al., 1996), *Lactobacillus gasseri* (Itoh et al., 1995), *Lactobacillus helveticus* (Bonade et al., 2001), *Lactobacillus lactis* (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2000), *Lactobacillus plantarum* (Kelly et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003; Todorov and Dicks, 2005; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2006), *Lactobacillus sake* (Mortvedt et al., 1991), *Lacto-*

bacillus salivarius (Flynn et al., 2002), *Lactococcus lactis* (Noonpakdee et al., 2003; Zendo et al., 2003; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008), *Leuconostoc gelidium* (Hastings et al., 1991), *Leuconostoc mesenteroides* (Hechard et al., 1992), *Pediococcus acidilactici* (Bhunja et al., 1984), *Pediococcus damnosus* (Green et al., 1997), *Pediococcus pentosaceus* (Osmanagaoglu et al., 2000), *Propionibacterium thoenii* (Lyon and Glatz, 1993) และ *Streptococcus thermophilus* (Ivanova et al., 1998) เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่ม lactic acid bacteria ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ เช่น *Bacillus coagulans* (Hyronimus et al., 1998) *Bacillus polyfermenticus* (Lee et al., 2001) *Bacillus thuringiensis* (Cherif et al., 2001) *Bacillus cereus* (Oscariz and Pisaborro, 2000) *Escherichia coli* (Braun et al., 1994) *Staphylococcus aureus* (Netz et al., 2002) *Staphylococcus warneri* (Sashihara et al., 2000) และ *Xanthomonas campestris* (Heu et al., 2001) เป็นต้น

ความสนใจในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินสืบเนื่องมาจากการพบว่า แบคทีเรียโอซิน บางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Spelhaug and Harlander, 1989) และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Daeschel, 1989) นอกจากนี้ยังมีความวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ในทางการแพทย์ (Ryan et al., 1998) และในอุตสาหกรรมอาหาร (Schillinger et al., 1991) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากหันมาให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยแบคทีเรียโอซิน

คุณสมบัติโดยทั่วไปของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียต่างชนิดกันมีคุณสมบัติทางเคมี และทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการทำลายจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

กัน เป็นต้น แต่สารที่จะถูกจัดเป็นแบคทีเรียโอซินต้องมีคุณสมบัติหลักๆ ที่เหมือนกันดังต่อไปนี้

1. เป็นโปรตีน

เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีน ดังนั้น แบคทีเรียโอซินจึงสามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยแบคทีเรียสามารถถูกยับยั้งได้โดยสารยับยั้งการสร้างโปรตีน

2. สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

แบคทีเรียโอซินบางชนิดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการฆ่าจุลินทรีย์ (bacteriocidal) เช่น แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* N014 (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2006) plantaricin KW 30 ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* KW 30 (Kelly et al., 1996) และ acidocin J 1229 ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229 (Tahara and Kanatani, 1996) เป็นต้น ในขณะที่แบคทีเรียโอซินบางชนิดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ (bacteriostatic) เช่น แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus sake* 148 (Sobrinho et al., 1991) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังมีแบคทีเรียโอซินบางชนิดที่เมื่อศึกษาในระบบที่เป็นแบบจำลอง (model system) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการฆ่าจุลินทรีย์ แต่เมื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตอาหารกลับไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ (Schillinger et al., 1991)

3. สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ

คุณสมบัตินี้ทำให้แบคทีเรียโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ

การที่แบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากก่อนที่แบคทีเรียโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอซินได้ แบคทีเรียโอซินต้องไปจับกับ

ตำแหน่งที่จำเพาะ (specific binding site หรือ specific receptor) ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอซิน

4. ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซิน

การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินต้องประกอบด้วยกระบวนการทรานสคริปชัน (transcription) และ ทรานสเลชัน (translation) เพื่อถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซิน (bacteriocin gene) โดยยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่ในพลาสมิด หรือเป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซมก็ได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในพลาสมิด เช่น coagulins ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* I₄ (Hyronimus et al., 1998) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus curvatus* IFPL 105 (Casla et al., 1996) และ acidocin B ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* M46 (van der Vossen et al., 1994) เป็นต้น ส่วนตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในโครโมโซม เช่น nizin Z ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Latococcus lactis* subsp. *lactis* TFF 221 (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* N014 (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2006) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* (Bonade et al., 2001) และ plantaricin KW 30 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* KW 30 (Kelly et al., 1996) เป็นต้น

ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะ (antibiotics)

ถึงแม้แบคทีเรียโอซิน และสารปฏิชีวนะจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่สารทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันหลายประการ ดังนี้

1. แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซิน ในขณะที่สารปฏิชีวนะเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีได้หลายรูปแบบ และมักถูกสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลง primary metabolite ไปเป็น secondary metabolite ก่อนที่จะถูกหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์

2. แบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ และจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอซินมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน ในขณะที่สารปฏิชีวนะบางชนิดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ ส่วนสารปฏิชีวนะบางชนิดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างไม่จำเพาะ

3. แบคทีเรียโอซินมีน้ำหนักโมเลกุลได้ตั้งแต่ประมาณ 2,000-3,000 Da ไปจนถึงประมาณ 30,000 Da ในขณะที่สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 2,000-3,000 Da

การตั้งชื่อแบคทีเรียโอซิน

โดยปกติแล้วการตั้งชื่อแบคทีเรียโอซินมักทำโดยการนำชื่อ genus หรือ species ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินแล้วเติมคำว่า “cin” ต่อท้าย ตัวอย่างเช่น

colicin เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย

Escherichia coli

monocin เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย

Listeria monocytogenes

staphylocin เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย

Staphylococcus aureus

plantaricin เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย

Lactobacillus plantarum เป็นต้น

นอกจากนี้แล้วในบางครั้งอาจมีการเติมตัวเลขหรือตัวอักษรต่อท้ายชื่อแบคทีเรียโอซินเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่อยู่ใน genus และ species เดียวกัน ตัวอย่างเช่น

plantaricin D เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* BFE 905 ส่วน plantaricin KW 30 เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* KW 30 เป็นต้น

กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ผ่านมา พบว่า แบคทีเรียโอซินต่างชนิดกันอาจมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน แบคทีเรียโอซินบางชนิดมีกลไกการทำงานแบบที่ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายตาย โดยไม่มีการแตกสลายของเซลล์ (bactericidal mode of action without cell lysis) ในขณะที่แบคทีเรียโอซินบางชนิดมีกลไกการทำงานแบบที่ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายแตกสลาย (bacteriolytic mode of action) ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่มีกลไกการทำงานแบบที่ไม่ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายแตกสลาย เช่น pediocin PD-1 (Green et al., 1997), plantaricin KW 30 (Kelly et al., 1996), acidocin J 1299 (Tahara and Kanatani 1996) และ assericin A (Itoh et al., 1995) เป็นต้น ส่วนตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่มีกลไกการทำงานแบบที่ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายแตกสลาย เช่น coagulins (Hyronimus et al., 1998), lactococin (Yelridim and Johnson 1998), pediocin AcH (Bhunja et al., 1991) และ plantaricin SIK-83 (Andersson et al., 1988) เป็นต้น

การจำแนกแบคทีเรียโอซิน

ในการจำแนกแบคทีเรียโอซิน นักวิทยาศาสตร์มักแยกพิจารณาแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกออกจากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้น ในที่นี้จึงจะกล่าวถึงการจำแนกแบคทีเรียโอซินออกเป็น 2 หัวข้อ คือ การจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก และการจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบ

การจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก

การจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน โครงสร้างทางเคมีของแบคทีเรียโอซิน และกลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซิน เป็นต้น

วิธีการในการจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกที่นิยมใช้อ้างอิง ได้แก่ วิธีการของ Jack et al. (1995) และวิธีการของ Klaenhammer (1993)

Jack et al. (1995) จำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกจากการที่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส (posttranslationally modified amino acid), disulfide bond, thiol group (-SH group) และกรดอะมิโน cysteine เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 1) ดังนี้

1. กลุ่มที่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส ซึ่งได้แก่ dehydroalanine, dehydrobutirine, lantionine และ β -methyl-lanthionine เรียกแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ว่า lanti-biotics

2. กลุ่มที่มี disulfide bond อย่างน้อย 1 พันธะ เรียกแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ว่า cystibiotics

3. กลุ่มที่มี thiol group (-SH group) 1 กลุ่ม เรียกแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ว่า thiolbiotics

4. กลุ่มที่ไม่มีกรดอะมิโน cysteine

Klaenhammer (1993) กล่าวว่า มวลโมเลกุล การทนต่อความร้อน การไวต่อเอนไซม์ต่างๆ การมีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส และกลไกการทำงาน เป็นเกณฑ์ในการจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกออกเป็น 4 กลุ่ม คือ class I, II, III และ IV bacteriocins

Class I bacteriocins

Class I bacteriocins เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ

ถอดรหัสเป็นส่วนประกอบ (เช่นเดียวกับแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotics ตามการจำแนกแบคทีเรียโอซินของ Jack et al. (1995) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้สามารถจำแนกออกได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ group Ia และ group Ib bacteriocins โดยอาศัยโครงสร้างของแบคทีเรียโอซินและประจุของแบคทีเรียโอซินเป็นเกณฑ์ในการจำแนก

group Ia bacteriocins

group Ia bacteriocins ประกอบด้วยแบคทีเรียโอซินที่มีรูปร่างเป็นเกลียว และมีประจุสุทธิเป็นบวก แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย จำนวนของกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัสของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของแบคทีเรียโอซิน ตัวอย่างเช่น pep5 มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส จำนวน 3 ตัว epidermin มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส จำนวน 4 ตัว subtilin และ nisin มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส จำนวน 5 ตัว เป็นต้น

group Ib bacteriocins

group Ib bacteriocins ประกอบด้วยแบคทีเรียโอซินที่มีรูปร่างกลม (globular shape) และมีประจุสุทธิเป็นลบ (anionic) หรือเป็นกลาง (neutral) ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ เช่น mutacin A, mersacidin, actagardine และ cinnamycin เป็นต้น

Class II bacteriocins

Class II bacteriocins เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่ทนความร้อนได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และไม่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้สามารถจำแนกออกได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ group IIa, IIb และ IIc bacteriocins

group IIa bacteriocins

group IIa bacteriocins เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้

(antilisterial bacteriocins) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้มี consensus sequence YGNGV (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val) ที่บริเวณ N-terminus และฆ่าเซลล์เป้าหมายโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งส่งผลให้เซลล์เป้าหมายตายในที่สุด เนื่องจากเซลล์เป้าหมายไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ของสารและไอออน (ions) ต่างๆ ได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ เช่น pediocin AcH, pediocin PA1, mesentericin Y105, sakacin A และ sakacin P เป็นต้น

group IIb bacteriocins

group IIb bacteriocins เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย โดยการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ต้องอาศัยแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิดทำงานร่วมกัน เช่น enterocin L50A ต้องทำงานร่วมกับ enterocin L50B, lactococcin Gα ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin Gβ และ lactococcin M ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin N เป็นต้น

group IIc bacteriocins

group IIc bacteriocins ประกอบด้วยแบคทีเรียโอซินที่ไม่สามารถถูกจัดให้อยู่ใน group IIa bacteriocins และ group IIb bacteriocins ได้ แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้จำแนกได้อีกเป็น 2 ประเภท คือ แบคทีเรียโอซินที่มีกรดอะมิโน cysteine และแบคทีเรียโอซินที่ไม่มีกรดอะมิโน cysteine ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ถูกจัดอยู่ใน group IIc bacteriocins ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

Class III bacteriocins

Class III bacteriocins เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่ไม่ทนความร้อน (heat labile) มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 kDa ส่วนใหญ่ผลิตโดยแบคทีเรียใน genus *Lactobacillus* ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ เช่น helveticin J ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* 481 และ lactacin B ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* เป็นต้น

Class IV bacteriocins

Class IV bacteriocins เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเป็น glycoprotein หรือ lipoprotein ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเป็น glycoprotein เช่น lactocin 27 และตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเป็น lipoprotein เช่น lactostreptocins

การจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบ

Kolter และ Moreno (1992) ได้จำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ colicins และ microcins

Colicins

แบคทีเรียโอซินในกลุ่ม colicins เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบและมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้มักมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำกัด (narrow antimicrobial spectrum) และในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบคทีเรียโอซินนี้จำเป็นต้องจับกับ receptor ที่จำเพาะที่อยู่ผิวของเซลล์เป้าหมาย

Microcins

แบคทีเรียโอซินในกลุ่ม microcins เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้มักถูกผลิตออกมาเมื่อแบคทีเรียผู้ผลิตอยู่ในระยะ stationary phase เช่น colicin V ที่ผลิตโดย *Escherichia coli* V และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6 kDa และ microcin C7 ถือว่ามีขนาดเล็กที่สุดในปัจจุบัน โดยแบคทีเรียโอซินดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 7 ตัวเท่านั้น

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของแบคทีริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ ตามการจำแนกแบคทีริโอซินโดย Jack et al. (1995)

แบคทีริโอซิน	มวลโมเลกุล (kDa)	จำนวนกรดอะมิโน	แบคทีเรียผู้ผลิต
Lantibiotics			
Actagardine	1.9	19	<i>Actinoplanes</i> spp.
Ancovenin	2.0	19	<i>Streptomyces</i> spp.
Cinnamycin	2.0	19	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Duramycin	2.0	19	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Epidermin	2.2	22	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gallidermin	2.2	22	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Lanthiopeptin	2.0	19	<i>Streptoverticillum cinnamoneus</i>
Mersacidin	1.8	19	<i>Bacillus</i> sp.
Nisin	3.4	34	<i>Lactococcus lactis</i>
Pep5	3.5	34	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Subtilin	3.3	32	<i>Bacillus subtilis</i>
Cystibiotics			
Carnobacteriocin A	5.1	53	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A
Cerein 7	4.9	56	<i>Bacillus cereus</i> Bc7
Lactacin F	5.6	57	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 11088
Leucocin A-UAL187	3.9	37	<i>Leuconostoc gelidium</i>
Mesentericin Y105	3.8	37	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105
Pediocin AcH	4.6	44	<i>Pediococcus acidilactici</i> H
Sakacin A	4.3	41	<i>Lactobacillus sake</i> Lb706
Sakacin P	4.4	43	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Thiolbiotics			
Lactococcin B	5.3	47	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
No cysteine			
Lactococcin A	5.8	54	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2130
Lactococcin G α	4.3	39	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG2081
Lactococcin G β	4.1	35	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG2081
Lactococcin M	4.3	48	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactococcin N	4.4	47	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ถูกจัดอยู่ใน group IIc bacteriocins ตามการจำแนกแบคทีเรียโอซินของ Klaenhammer (1993)

แบคทีเรียโอซิน	แบคทีเรียผู้ผลิต	น้ำหนักโมเลกุล (Da)	จำนวนกรดอะมิโน	จำนวน cysteine
Cerein 7	<i>Bacillus cereus</i> Bc7	4,893	56	2
Enterocin B	<i>Enterococcus faecium</i> T136	5,465	53	2
Carnobacteriocin A	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	5,053	53	2
Lactococcin A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	5,778	54	0
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> WM4			
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG2130			
Lactococcin B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	5,328	47	1
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> WM4			
Divergicin A	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	4,224	46	2
Acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	5,754	59	0

การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียโอซิน

ด้วยเหตุที่แบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ จึงมีนักวิทยาศาสตร์พยายามใช้แบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียในกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งแบคทีเรียโอซินดังกล่าวจะมีผลต่อจุลินทรีย์เป้าหมายเท่านั้น โดยไม่ไปมีผลต่อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของผู้บริโภค

ในปัจจุบัน nisin เป็นแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับจาก American Food and

Drug Administration (FDA) ให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการทดลองใช้ nisin ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม (dairy products) ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (fermented food) และผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋อง (canned food) เป็นต้น อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแบคทีเรียโอซินชนิดอื่นๆ จะยังไม่ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย แต่ก็มีความพยายามในการศึกษาเพื่อพัฒนาแบคทีเรียโอซินหลายชนิดให้สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและ/หรือในทางการแพทย์ได้อย่างปลอดภัย (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 8 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอสินบางชนิดที่ได้รับการนำไปทดลองใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและ/หรือในทางการแพทย์

แบคทีเรียโอสิน	แบคทีเรียผู้ผลิต	การนำไปใช้	เอกสารอ้างอิง
Sakacin A	<i>Lactobacillus sake</i> Lb 706	Meat industry	Schillinger et al. 1991
Sakacin 674	<i>Lactobacillus sake</i> Lb 674	Meat industry	Yousef et al. 1991
Bifidocin B	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCFB 1454	Food preservation	Yildirim and Johnson 1998
Plantaricin LP 84	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIM 2084	Food preservation	Suma et al. 1998
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC 3147	Prevention of bovine mastitis	Ryan et al. 1998
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Treatment of endocarditis, abscesses, Skin infections	Kellner et al. 1988

สรุป

แบคทีเรียโอสินเป็นสารประเภทโปรตีนที่สร้างโดยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ด้วยเหตุที่แบคทีเรียโอสินมีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์เป้าหมายดังนั้นจึงได้รับความสนใจการนำมาใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่อาจปนเปื้อนในอาหารซึ่งจะทำให้อาหารปลอดภัยและเก็บได้นานยิ่งขึ้น ทั้งยังไม่มีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของผู้บริโภค ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีเพียง nisin เท่านั้นที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย แต่จากผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำแบคทีเรียโอสินไปใช้ประโยชน์ที่มีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงมีความเป็นไปได้อย่างมากที่ในอนาคตจะมีแบคทีเรียโอสินอีกหลายชนิดที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้อย่างถูกต้องตามกฎหมายเช่นเดียวกับ nisin

เอกสารอ้างอิง

Andersson, R. E., Daeschel, M. A. and Hassan, H. M. (1988). Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie*. 70: 381-390.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C. and Ray, B. (1984). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *Journal of Applied Bacteriology*. 65: 261-268.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchayanand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*. 70: 25-33.

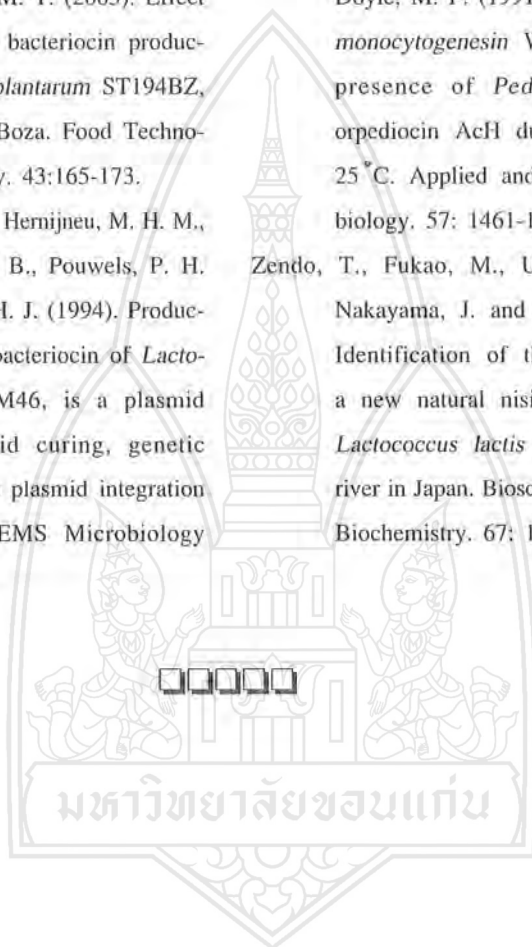
Bonade, A., Murelli, F., Vescovo, M. and Scolari, G. (2001). Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiology*. 33: 153-158.

- Braun, V., Pils, H. and Grob, P. (1994). Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes and evolution. *Archives of Microbiology*. 161: 199-206.
- Casla, D., Requena, T. and Gomez, R. (1996). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *Journal of Applied Bacteriology*. 81: 35-41.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 243-247.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technology*. 43: 164-167.
- Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S. H., Doi, K., Ohmomo, S. and Ogata, S. (2001). Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecium* K-4. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 65: 247-253.
- Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I. F. and Collins, J. K. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology*. 148: 973-984.
- Green, G., Dicks, L. M. T., Bruggeman, G., Vandamme, E.J. and Chikindas, M. L. (1997). Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 127-132.
- Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1991). Characterization of leuconocin A-UAL 187 and cloning of bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. *Journal of Bacteriology*. 173: 7491-7500.
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*. 138: 2725-2731.
- Heu, S., Oh, J., Kang, Y., Ryu, S., Cho, S. K., Cho, V. and Cho, M. (2001). gly gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4105-4110.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C. and Urdaci, M. C. (1998). Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I₄. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 42-50.
- Itoh, T., Fujimoto, Y., Kawai, Y., Toba, T. and Saito, T. (1995). Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Letters in Applied Microbiology*. 21: 137-141.
- Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T. S., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Kotova, N., Dousset, X. and Boyaval, P. (1998). Characterization of a bacteriocin

- produced by *Streptococcus thermophilus* 81. International Journal of Food Microbiology. 42: 147-158.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiology Review. 59: 171 -200.
- Jack, R. W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R. E. H. and Hickey, M. W. (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. Applied and Environmental Microbiology. 62: 2897-2903.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. and Wollman, E. (1953). De'finition de quelques termes relatifs a` la lysoge'nie. Annales de l'Institut Pasteur (Paris). 84: 222-224.
- Kellner, R., Jung, G., Horner, T., Zahner, H., Schnell, N., Entain, K. D. and Gotz, F. (1988). Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. European Journal of Biochemistry. 177: 53-59.
- Kelly, W. J., Asmundson, R. V. and Huang, C. M. (1996). Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Bacteriology. 81: 657-662.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12: 39-86.
- Kolter, R. and Moreno, F. (1992). Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. Annual Review of Microbiology. 46: 141-163.
- Lee, K. H., Jun, K. D., Kim, W. S. and Paik, H. D. (2001). Partial characterization of polyfermentacin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. Letters in Applied Microbiology. 32: 146-151.
- Lyon, W. J. and Glatz, B. A. (1993). Isolation and purification of propionin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. Applied Environmental Microbiology. 59: 83-88.
- Metivier, A., Boyaval, P., Duffes, F., Dousset, X., Compoint, J. P. and Marion, D. (2000). Triton X-114 phase partitioning for isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. Letters in Applied Microbiology. 30: 42-46.
- Mortvedt, C. I., Nissen-Meyer, J., Stetten, K. and Nes, I. F. (1991). Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Applied and Environmental Microbiology. 57: 1829-1834.
- Netz, D. J., Pohl, R., Beck Sickinger, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., Bastos Mdo, C. and Sahl, H. G. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. Journal of Molecular Biology. 319: 745-756.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology. 81: 137-145.

- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. and Onilude, A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. 2: 219-227.
- Oh, S., Kim, S. H. and Worobo, R. W. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*. 83: 2747-2752.
- Oscariz, J. C. and Pisaborro, A. G. (2000). Characterization and mechanism of action of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 1-10.
- Osmanagaoglu, O., Beyatli, Y., Gunduz, U. and Sacilik, S. C. (2000). Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. *Journal of Basic Microbiology*. 40: 233-241.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2000). A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. *ScienceAsia*. 26: 195-200.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2006). Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from Nham, a traditional Thai fermented pork. *Journal of Food Protection*. 69: 1937-1943.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2008). Incidence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF 221 isolated from Thai fermented foods. *Journal of Food Protection*. 71: 2024-2029.
- Ryan, M. P., Meaney, W. J., Ross, R. P. and Hill, C. (1998). Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2287-2290.
- Sashihara, T., Kimura, H., Higuchi, T., Adachi, A., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000). A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64: 2420-2428.
- Schillinger, U., McKay, L. L. and Lucke, F. K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology*. 70: 473-478.
- Sobrinho, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Fernandez, M. F., Sanz, B. and Hernandez, P. E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 13: 1-10.
- Spelhaug, S. R. and Harlander, S. A. (1989). Inhibition of Food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*. 52: 856-862.
- Suma, K., Misra, M. C. and Varadaraj, M. C. (1998). Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology*. 40: 17-25.

- Tahara, T. and Kanatani, K. (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 669-677.
- Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2005). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technology and Biotechnology*, 43:165-173.
- van der Vossen, J. M. B. M., van Hest, M. H. M., Leer, R. J., ten Brink, B., Pouwels, P. H. and Huis in 't Veld, J. H. J. (1994). Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46, is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by an in vitro plasmid integration and gene transfer. *FEMS Microbiology Letters*, 116: 333-340.
- Yildirim, Z. and Johnson, M. G. (1988). Characterisation and antimicrobial spectrum of ifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*, 61: 47-51.
- Yousef, A. E., Luchansky, J. B., Degnan, A. J. and Doyle, M. P. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in Weiner exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* orpediocin AcH during storage at 4 and 25°C. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1461-1467.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K.. (2003). Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67: 1616-1619.





วิถีชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรีย

Biosynthetic Pathways for Polyhydroxyalkanoate

in Bacteria

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล¹

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ในฐานะพลาสติกทางเลือกใหม่สำหรับอนาคต ปัจจุบันเป็นที่ทราบว่า PHA เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียหลายชนิด แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์และสะสม PHA ได้ในปริมาณสูง จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาการผลิต PHA ไปสู่ระดับอุตสาหกรรมโดยอาศัยการหมักของแบคทีเรียเป็นพื้นฐาน แต่เนื่องจากการพัฒนากรรมวิธีการหมักให้มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีความเข้าใจที่กระจ่างชัดเกี่ยวกับสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะรายละเอียดที่เกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์สารหรือผลิตผลการหมักที่ต้องการ รวมทั้งความเข้าใจถึงกลไกการควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์นั้นๆ ด้วย ดังนั้น ในระยะที่ผ่านมาจึงมีการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อที่จะทำความเข้าใจวิถีชีวสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรียให้กระจ่างชัด บทความปริทัศน์นี้เป็นการรวบรวมรายละเอียดทางวิชาการ รวมถึงลำดับการค้นพบข้อบ่งชี้ทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ ที่ช่วยให้ภาพรวมเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรียมีความชัดเจนขึ้น

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a class of biopolymer which receiving much attention as alternative biodegradable substitutes for the conventional petroleum-based plastics. Today PHAs are known to be macromolecules synthesized by many living bacteria. Some bacterial species have been reported to possess capability to synthesize and accumulate high level of PHA leading to the idea of utilization of the organisms for fermentation based production of PHAs in industrial scale. To succeed the development an efficient production process, knowledge concerning the physiological aspects, particularly on the specific pathways of PHA biosynthesis, of the selected bacteria is essential. Therefore, intensive efforts focused on

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา 13000

the demystification of PHA biosynthetic pathways were initiated throughout the past decades. This review highlights the body of knowledge and significant findings that have contributed to better understanding on the main metabolic routes of PHA biosynthesis in various bacteria.

คำสำคัญ : พอลิเมอร์ชีวภาพ ชีวสังเคราะห์ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต วิถีเมแทบอลิซึม

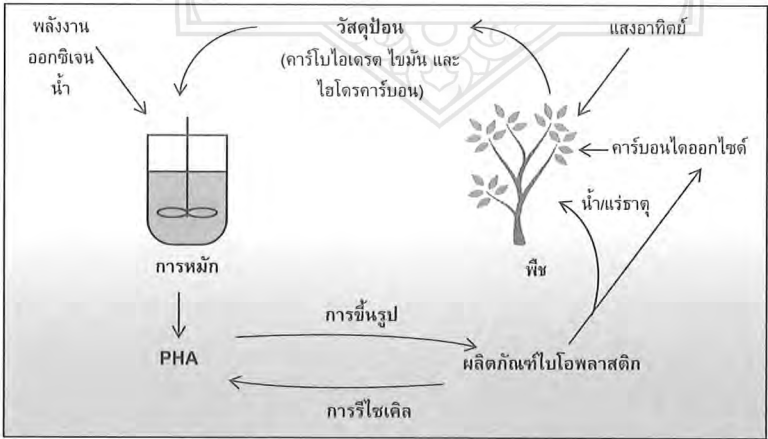
Keywords : Biopolymer, Biosynthesis, Polyhydroxyalkanoate, Metabolic pathway

บทนำ

ในระยะสองทศวรรษที่ผ่านมา ได้เกิดภาวะความตระหนักขึ้นในแวดวงนักวิทยาศาสตร์และนักวิชาการสาขาต่างๆ เกี่ยวกับความจำเป็นในการแสวงหาพอลิเมอร์ทางเลือกใหม่ สำหรับนำมาใช้ทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้จากปิโตรเคมี ความตระหนักดังกล่าวนี้เกิดจากภาวะกดดัน 2 ประการหลัก ประการแรกสืบเนื่องมาจากปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการสะสมของพลาสติกที่ย่อยสลายยาก และประการถัดมา คือ ความกังวลเกี่ยวกับความมั่นคงทางวัสดุประเภทพอลิเมอร์อื่นเนื่องมาจากการร่อยหรอลงของน้ำมันดิบสำรองได้พิภพ ซึ่งในปัจจุบันถือว่าเป็นแหล่งพอลิเมอร์สังเคราะห์แหล่งใหญ่ที่สุดที่ป้อนเข้าสู่ระบบอุตสาหกรรม ความกังวลทั้งสองประการนี้ได้กระตุ้นให้เกิดความตื่นตัวในการแสวงหาพอลิเมอร์ทางเลือกใหม่ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีปริมาณเพียงพอที่จะคำนวณระบบอุตสาหกรรมในอนาคตได้

และพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) ที่สามารถสังเคราะห์และย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ ก็เป็นทางเลือกที่หลายฝ่ายกำลังให้ความสนใจ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHA เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทหนึ่ง มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกใกล้เคียงกับพอลิเมอร์จากปิโตรเคมีอย่าง พอลิโพรพิลีน (Byrom, 1987) แต่มีสมบัติที่ได้เปรียบพลาสติกจากปิโตรเคมีอยู่ 3 ประการ คือ 1) เป็นวัสดุที่สามารถสร้างขึ้นทดแทนใหม่ได้ทางธรรมชาติ 2) สามารถย่อยสลายได้ง่ายโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) และ 3) มีความเข้ากันได้กับร่างกายของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) (รูปที่ 1) PHA จึงมีสมบัติที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และยังสามารถนำไปผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์และเภสัชกรรมเพื่อใช้กับร่างกายมนุษย์ได้ด้วย (Verlinden et al., 2007)

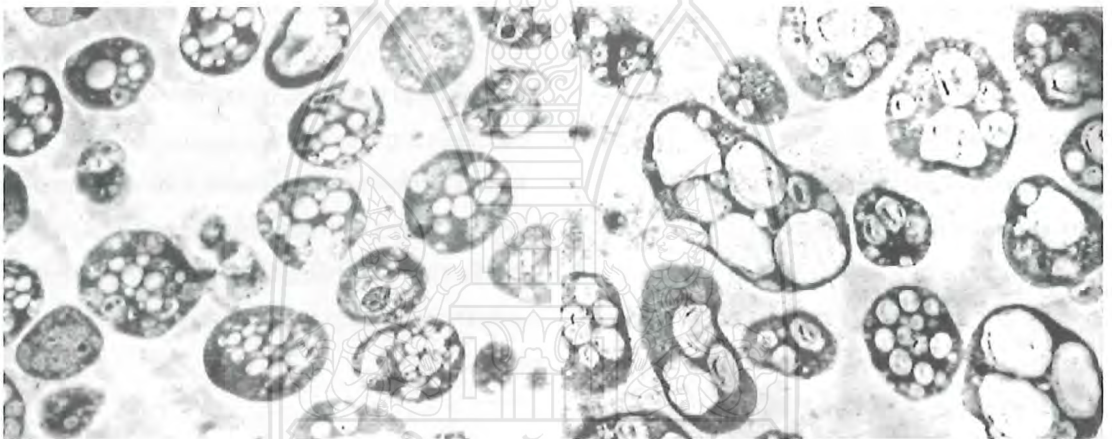


รูปที่ 1 วงจรของ PHA ที่แสดงถึงสมบัติของวัสดุที่สามารถสร้างขึ้นทดแทนใหม่ได้ทางธรรมชาติ

ในธรรมชาติมีพืช เชื้อรา และแบคทีเรีย หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ แต่กลุ่มที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHA ได้ในปริมาณสูงจะเป็นแบคทีเรีย ในปัจจุบันคาดว่า มีแบคทีเรียมากกว่า 300 ชนิดที่ถูกระบุว่าสามารถผลิตและสะสม PHA ได้ (Nubia et al., 2007; Volova et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่สามารถผลิตและสะสม PHA ได้ในปริมาณสูงๆ จะมีเพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในจีนัส *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas*

การค้นพบแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHA ได้ในปริมาณสูงเหล่านี้ ได้จุดประกายความคิดที่จะพัฒนาการผลิต PHA ไปสู่ระดับการค้า โดยอาศัยการหมัก

ของแบคทีเรียเป็นพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตาม การใช้แบคทีเรียในการผลิต PHA ระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องทราบรายละเอียดทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ PHA ในแบคทีเรียชนิดนั้นๆ เสียก่อน ทั้งนี้เพื่อจะได้พัฒนาระบบการหมักที่สอดคล้องกับพื้นฐานทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่เลือกใช้ อันจะนำไปสู่การควบคุมการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงสุดนั่นเอง ในบทความนี้จะเป็นการทบทวนรายละเอียดทางวิชาการเกี่ยวกับวิถีเมแทบอลิซึมที่แบคทีเรียใช้ในการแปรรูปแหล่งคาร์บอนประเภทต่างๆ ให้ได้ผลิตผลเป็น PHA ที่สะสมภายในเซลล์ (รูปที่ 2) (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงการสะสม PHA ในรูปของเม็ดกรานูลภายในเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* (ที่มา: Segura et al., 2003)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHA พร้อมด้วยชนิดแหล่งคาร์บอนที่ใช้ และชนิดของ PHA ที่สังเคราะห์ได้

แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	ชนิดของ PHA ที่ผลิตได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas punctata</i>	กรดไขมัน	P(3HB-co-3HH)	Fukui and Doi (1997), Fukui et al. (1998)
<i>Bacillus cereus</i>	กลูโคส โมลาส แป้ง	PHB	Valappil et al. (2007)
<i>Cupriavidus</i> sp. USMAA9-39	γ -butyrolactone, 1,4-butanediol, กรดโอเลอิก	P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HV-co-4HB)	Amirul et al. (2007)
<i>Ralstonia pickettii</i> 61A6	กากน้ำตาลอ้อย	scl-PHA	Bonatto et al. (2004)
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	ไขมันเหลือทิ้งจากการผลิตแรมโนส	PHA	Füchtenbusch et al. (2000)
<i>Ralstonia eutropha</i> NCIMB 11599	เศษแป้งมันฝรั่ง	PHB	Haas et al. (2008)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	ไขมันเหลือทิ้งจากการผลิตแรมโนส	PHA	Füchtenbusch et al. (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	แรมโนไลปิด	PHA	Marsudi et al. (2008)

วิถีชีวสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรีย

ก่อนที่จะมีความเข้าใจวิถีชีวสังเคราะห์ที่สมบูรณ์ นักวิทยาศาสตร์ได้ทราบมาเป็นเวลานานแล้วว่า ในแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นเอนไซม์สำคัญ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของ PHA โดยใช้สารประเภท (R)-3-hydroxyacyl-CoA เป็นซับสเตรต (Rehm, 2003) แต่เนื่องจาก (R)-3-hydroxyacyl-CoA เป็นสารมัธยन्ตร์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นระหว่างการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้นหมายความว่า ก่อนที่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์จะเกิดขึ้น แบคทีเรียจะต้องมีกระบวนการในการเตรียม (R)-3-hydroxyacyl-CoA ให้กับ PHA synthase เสียก่อน จึงทำให้เกิดข้อสงสัยว่า ลำดับปฏิกิริยาในการแปรรูปแหล่งคาร์บอนให้ได้ (R)-3-hydroxyacyl-CoA ในเซลล์ของแบคทีเรียดำเนินไปอย่างไร และผลจากการค้นคว้าโดยวิจัยในลำดับต่อๆ มา ทำให้ทราบว่า แบคทีเรียสามารถเตรียม (R)-3-hydroxyacyl-CoA ได้โดยอาศัยวิถีเมแทบอลิซึม

ที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของแบคทีเรียและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถสรุปได้เป็น 3 ช่องทางหลัก ดังแสดงในรูปที่ 3

(1) ชีวสังเคราะห์ P(3HB) ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต

เนื่องจากพอลิเมอร์ชีวภาพในกลุ่ม PHA มีด้วยกันหลายชนิด แต่ละชนิดก็มีสมบัติเชิงวัสดุศาสตร์ที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของหน่วยมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบและโครงสร้างโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ ดังนั้น จึงมีการแบ่ง PHA ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามจำนวนคาร์บอนอะตอมของหน่วยมอนอเมอร์ ได้แก่ 1) PHA ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์สายสั้น (short-chain-length PHA : scl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ประเภท 3-hydroxyalkanoate (3HA) ที่มีคาร์บอน 3-5 อะตอม และ 2) PHA ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์สายยาวปานกลาง (medium-chain-length PHA : mcl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ประเภท 3HA ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม (Madison and Huisman, 1999)

Poly(3-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB) จัดเป็น scl-PHA ชนิดที่พบมากที่สุดทางธรรมชาติ สามารถพบได้ในเซลล์ของแบคทีเรียหลากหลายชนิด และยังเป็น PHA เพียงชนิดเดียวที่นักวิทยาศาสตร์รู้จักตลอดระยะเวลาเกือบ 50 ปีนับจากการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1926 ในเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926) ก่อนจะเริ่มมีการค้นพบ PHA ชนิดอื่นๆ ตามมาในทศวรรษที่ 1970 ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ของ PHA ในแบคทีเรียจึงเริ่มมาจากการศึกษาชีวสังเคราะห์ของ P(3HB) เป็นอันดับแรก โดยส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* (ชื่อเดิม *Alcaligenes eutrophus*) เป็นหลัก เพราะเป็นแบคทีเรียที่รู้จักอย่างกว้างขวางว่าสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง และด้วยการศึกษาทั้งในเชิงชีวเคมี สรีรวิทยาและอนุพันธุศาสตร์อย่างต่อเนื่องตลอดช่วงทศวรรษที่ 1980 ทำให้ภาพรวมของวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) กระฉ่างชัดขึ้นเป็นลำดับ (Haywood et al., 1988(I); Haywood et al., 1988(II); Schubert et al. 1988; Haywood et al., 1989; Peoples and Sinskey, 1989(1); Peoples and Sinskey, 1989(2)) ในที่สุดก็สามารถสรุปได้ว่าวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ใน *R. eutropha* จะดำเนินผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ได้ acetyl-CoA จากนั้น acetyl-CoA จะถูกส่งต่อเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์ 3 ขั้นตอน เพื่อให้ได้ P(3HB) ซึ่งในวิถีชีวสังเคราะห์ 3 ขั้นตอนดังกล่าวนี้มีเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้อง 3 ชนิด ได้แก่ β -ketothiolase (PhaA), acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) และ PHB synthase (PhaC) โดย β -ketothiolase ทำหน้าที่ควมรวม acetyl-CoA 2 โมเลกุลให้เป็น Acetoacetyl-CoA จากนั้น Acetoacetyl-CoA จะถูกรีดิวซ์โดย NADH จากการเร่งปฏิกิริยาของ acetoacetyl-CoA reductase ได้เป็น (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA ซึ่งท้ายที่สุดจะถูกนำไปสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้เป็น P(3HB) โดยการเร่งปฏิกิริยาของ PHB synthase (รูปที่ 3 Pathway I) (Tsuge et al., 2005)

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า วิถี 3 ขั้นตอนของการสังเคราะห์ P(3HB) เป็นวิถีชีวสังเคราะห์ที่เรียบง่ายที่สุดในการสังเคราะห์ PHA และได้ถูกใช้เป็นบรรทัดฐานในการติดตามวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ด้วย ทำให้ทราบว่า นอกเหนือจาก *R. eutropha* แล้ว ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ P(3HB) ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ 3 ขั้นตอนนี้ จึงมีความเชื่อวิถีชีวสังเคราะห์ 3 ขั้นตอนนี้เป็นวิธียอดนิยมหลักที่แบคทีเรียในธรรมชาติชนิดต่างๆ ใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สังเคราะห์ P(3HB) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก อาทิ *B. megaterium*, *Azotobacter vinelandii* (Segura et al. 2003) และ *Thermus thermophilus* (Pantazaki et al., 2003) เป็นต้น และล่าสุดก็มีรายงานว่าแบคทีเรียน้ำเค็ม *Saccharophagus degradans* ATCC 43961 สามารถสังเคราะห์ไฮโดรพอลิเมอร์ ชนิด P(3HB) จากกลูโคสเช่นเดียวกับ *R. eutropha* (González-García et al., 2008) จึงมีความเป็นไปได้ว่าวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) ของ *S. degradans* จะดำเนินไปในวิถีเดียวกับ *R. eutropha* ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้ก็สอดคล้องกับที่ Kalia et al. (2003) เคยรายงานไว้ว่า พบยีนที่ น่าจะเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase และ PHA synthase บนจีโนมของ *S. degradans* ด้วย

(2) วิถีชีวสังเคราะห์ PHA ผ่านวิถีบีตาออกซิเดชันของกรดไขมัน

ระหว่างที่เฝ้างานเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ P(3HB) เริ่มคลี่คลาย ปริศนาชิ้นใหม่ที่ท้าทายนักวิจัยด้าน PHA ก็ปรากฏขึ้นในเวลาไล่เลี่ยกัน เมื่อ de Smet et al. (1983) รายงานว่าในเซลล์ของ *P. oleovorans* ที่เจริญใน n-octane เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) มีการสะสมกรานูลของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผิดแผกไปจาก P(3HB) ซึ่งผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบ่งชี้ว่า พอลิเมอร์ดังกล่าวเป็น PHA อีกชนิดที่มี (R)-3-hydroxyoctanoate (3HO) และ (R)-3-hydroxyhexanoate (3HH) เป็นมอนอเมอร์ และ

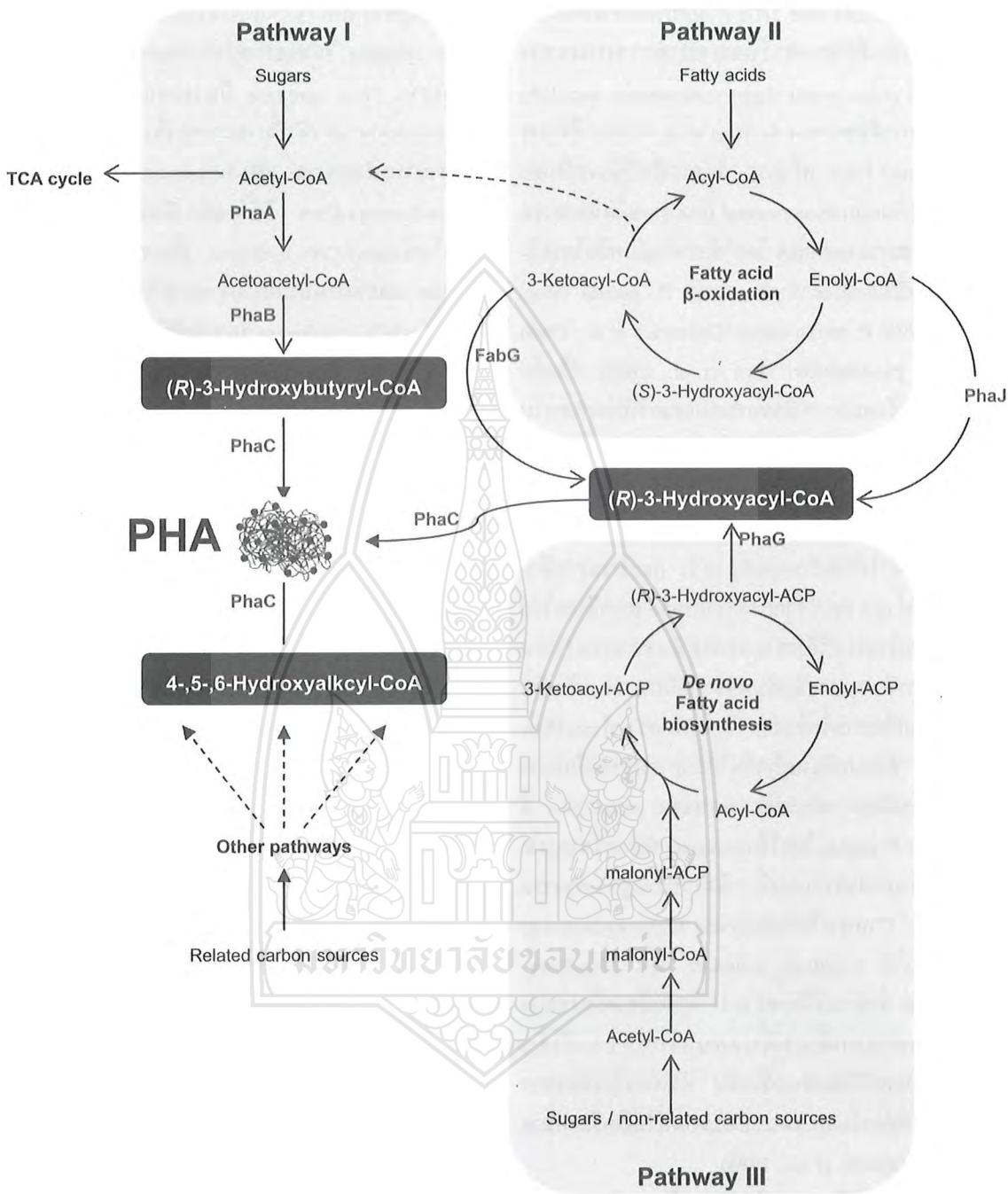
เนื่องจากทั้ง 3HO และ 3HH ต่างก็เป็นกรดไฮดรอกซี-อัลคานอยิกที่มีสายคาร์บอนขนาดยาวปานกลาง (medium chain length Hydroxyalkanoates: mcl-HA) จึงถือว่าการค้นพบของ de Smet et al. (1983) เป็นการค้นพบ mcl-PHA ครั้งแรก ถัดจากนั้นก็มีการค้นพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonad* อีกหลายชนิดที่สามารถผลิตและสะสม mcl-PHA โดยใช้กรดไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน อาทิ *P. putida* (Hori et al., 1994) *P. resinovorans* (Cromwick et al., 1996) และ *P. pseudomallei* (Das et al., 2005) เป็นต้น ยิ่งกว่านั้นยังพบว่า ชนิดของมอนอเมอร์ที่ประกอบใน mcl-PHA ที่สังเคราะห์โดย *Pseudomonad* จะมีความสัมพันธ์กับชนิดของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างการสลายกรดไขมันซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน (Steinbüchel, 1991) ทำให้เกิดข้อสมมติฐานว่า กระบวนการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA จากกรดไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์น่าจะดำเนินผ่านวิถีบีตาออกซิเดชันของกรดไขมัน หรือมีการดึงเอาสารมัธยันตร์จากวิถีบีตาออกซิเดชันไปเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ mcl-PHA

ข้อสมมติฐานข้างต้นได้รับการพิสูจน์เมื่อมีรายงานผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ mcl-PHAs ที่สะสมใน *P. putida* โดยใช้ decanoate ที่ทำเครื่องหมาย ^{13}C บนตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ซึ่งผลปรากฏว่า สามารถตรวจพบ ^{13}C เฉพาะในโมเลกุลของ 3-hydroxydecanoate แต่ไม่พบใน 3-hydroxyoctanoate และ 3-hydroxyhexanoate ซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่า ^{13}C ที่เป็นเครื่องหมายนั้นถูกแยกออกตั้งแต่ขั้นตอนแรกสุดของลำดับปฏิกิริยาของวิถีบีตาออกซิเดชัน ทำให้เหลือเพียงสารมัธยันตร์ที่มีคาร์บอน 8 และ 6 อะตอมที่ไม่มีเครื่องหมายกำกับ (Huijberts et al., 1994)

ในวิถีบีตาออกซิเดชันจะมี trans-2-enoyl-CoA เป็นสารมัธยันตร์ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxyacyl-CoA ได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ enoyl-CoA hydratase ซึ่งโดยปกติในวิถีบีตาออกซิเดชันก็จะมีเอนไซม์ enoyl-CoA hydratase อยู่แล้ว เพียงแต่เป็นชนิดที่จำเพาะต่อ S-enantiomer เท่านั้น จึงทำให้

ได้ผลปฏิกิริยาเป็น (S)-3-hydroxyacyl-CoA ซึ่งเอนไซม์ PHA synthase ไม่สามารถนำไปสังเคราะห์ PHA ได้ เนื่องจาก PHA synthase มีความจำเพาะต่อ (R)-3-hydroxyacyl-CoA เท่านั้น เพราะฉะนั้น การที่แบคทีเรียจะสามารถสังเคราะห์ (R)-3-hydroxyacyl-CoA จาก trans-2-enoyl-CoA ได้โดยตรงจึงจำเป็นจะต้องมีเอนไซม์ enoyl-CoA hydratase ที่จำเพาะต่อ R-enantiomer และที่ผ่านมาก็มีรายงานหลายฉบับระบุว่าพบ (R)-enoyl-CoA hydratase ในแบคทีเรียหลายชนิด อาทิ *P. aeruginosa* และ *A. punctata* (ชื่อเดิม *Aeromonas caviae*) (Fukui and Doi, 1997; Fukui et al., 1998) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ต่างก็สามารถสังเคราะห์ mcl-PHA จากกรดไขมันได้

A. punctata เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถสังเคราะห์ PHA จากกรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ได้ แต่มีเอกลักษณ์พิเศษ คือ เมื่อเจริญในกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ *A. punctata* จะสามารถผลิตโคพอลิเมอร์แบบสลับ ที่มี 3-hydroxybutyrate (3HB) และ 3-hydroxyhexanoate (3HH) เป็นองค์ประกอบ (Fukui and Doi, 1997) เหตุผลก็เพราะว่าเอนไซม์ (R)-enoyl-CoA hydratase ของ *A. punctata* มีความจำเพาะต่อ trans-2-enoyl-CoA ที่มีสายคาร์บอนระหว่าง 4 ถึง 6 อะตอม จึงทำให้ได้เฉพาะ (R)-3-hydroxybutyryl-CoA และ (R)-3-hydroxyhexanoyl-CoA ที่มีคาร์บอน 4 และ 6 อะตอม ตามลำดับ เป็นมอนอเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ PHA (Fukui et al., 1998) ส่วน *P. aeruginosa* จะมีเอนไซม์ (R)-enoyl-CoA hydratase อยู่ถึง 4 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ PhaJ1, PhaJ2, PhaJ3 และ PhaJ4 แต่ละไอโซฟอร์มมีความจำเพาะต่อซัสเตรตที่แตกต่างกันออกไป (Tsuge et al., 2000; Tsuge et al., 2003)



รูปที่ 3 ภาพรวมวิถีชีวสังเคราะห์ PHA แบบที่เรีย ประกอบด้วยวิถีปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 3 วิถี PhaA: b-ketothiolase; PhaB: NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC: PHA synthase; PhaG: 3-hydroxyacyl-ACP: CoA transacylase; PhaJ: (R)-enolyl-CoA hydratase

นอกจาก trans-2-enoyl-CoA แล้ววิถีปฏิกิริยาออกซิเดชันยังมีสารมัธยันตร์อีก 2 ชนิดที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น (R)-3-hydroxyacyl-CoA ได้เช่นกัน นั่นคือ (S)-3-hydroxyacyl-CoA และ 3-ketoacyl-CoA ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-CoA epimerase และ 3-ketoacyl-CoA reductase (FabG) (Steinbüchel and Hein, 2001) แต่อย่างไรก็ตาม ในแบคทีเรียส่วนใหญ่ บทบาทของ 3-hydroxyacyl-CoA epimerase และ 3-ketoacyl-CoA reductase ไม่ใคร่จะโดดเด่นนัก เมื่อเทียบกับ (R)-enoyl-CoA hydratase ดังนั้น ในปัจจุบันจึงเชื่อว่า (R)-enoyl-CoA hydratase เป็นเอนไซม์สำคัญทำหน้าที่เป็นเสมือนสะพานสายหลักที่เชื่อมระหว่างวิถีปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA (รูปที่ 3 - Pathway II)

(3) ชีวสังเคราะห์ผ่านวิถี de novo ของการสังเคราะห์กรดไขมัน

ในช่วงทศวรรษที่ 1990 นักวิจัยเริ่มสังเกตเห็นว่า แบคทีเรียในกลุ่ม Pseudomonad สามารถใช้แหล่งคาร์บอนหลากหลายชนิด ในการสังเคราะห์ mcl-PHA แม้แต่สารประกอบคาร์บอนอย่างง่าย เช่น จีเซอรอล กลูโคส และ กลูโคส (Haywood et al., 1990; Timm and Steinbüchel, 1990; Huijberts et al., 1992) ทำให้เกิดข้อสงสัยขึ้นมามากว่า วิถีชีวสังเคราะห์ mcl-PHA จากสารประกอบคาร์บอนอย่างง่ายเหล่านั้นเกิดขึ้นอย่างไรและดำเนินผ่านวิถีเมแทบอลิซึมใด

จากรายงานของ Haywood et al. (1990) ที่ระบุว่า *Pseudomonas* sp. NCIMB 40135 สามารถสังเคราะห์ mcl-PHA ที่ประกอบด้วย 3-hydroxydecanoate (3HD) เป็นองค์ประกอบหลัก โดยใช้โซเดียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งข้อสังเกตในกรณีนี้คือ โมเลกุลของหน่วยมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่าจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของซัสเตรต ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานเบื้องต้นว่า ชีวสังเคราะห์ PHA ในกรณีนี้ไม่ได้ดำเนินผ่านวิถีปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพราะถ้าดำเนินผ่านวิถีปฏิกิริยาออกซิเดชัน

จำนวนอะตอมคาร์บอนในโมเลกุลของหน่วยมอนอเมอร์ในสาย PHA จะต้องเท่ากับหรือน้อยกว่าจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของซัสเตรตเสมอ เนื่องจากอะตอมคาร์บอนซัสเตรตจะถูกตัดให้สั้นลงทีละ 2 อะตอมตามลำดับปฏิกิริยาปฏิกิริยาออกซิเดชัน

กระทั่ง Huijberts et al. (1992) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ mcl-PHA ของ *P. putida* KT2442 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า mcl-PHA สังเคราะห์ได้จะประกอบด้วยมอนอเมอร์ชนิด 3HD เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้น ยังพบมอนอเมอร์ชนิดอื่นๆ อีก 6 ชนิด ได้แก่ 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxyoctanoate, 3-hydroxydodecanoate, 3-hydroxydodecenoate, 3-hydroxytetradecanoate และ 3-hydroxytetradecenoate ซึ่งทั้งหมดเป็นโนโมเมอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่าหรือเท่ากับกลูโคส แต่ในงานวิจัยนี้ยังพบข้อเท็จจริงที่สำคัญอีกประการคือ โมเลกุลของมอนอเมอร์เหล่านี้ ล้วนมีโครงสร้างที่ตรงกับโมเลกุลของ 3-hydroxyacyl-ACP (3-hydroxyacyl-carrier protein) ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในวิถี de novo ของการสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งมีการตรวจพบในเซลล์ของ *P. putida* KT2442 ระหว่างการเจริญในกลูโคสด้วยเช่นกัน และการค้นพบนี้ก็นำไปสู่ข้อสันนิษฐานที่ว่า วิถีชีวสังเคราะห์ mcl-PHA จากการประกอบคาร์บอนอย่างง่าย หรือแหล่งคาร์บอนไม่เกี่ยวข้อง (non-related carbon source) น่าจะดำเนินผ่านวิถี de novo ของการสังเคราะห์กรดไขมัน นั่นเอง อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการค้นคว้าวิจัยในลำดับต่อไปจะมีการอ้างอิงข้อสันนิษฐานของ Huijberts et al. (1992) อยู่เนืองๆ แต่ก็ยังไม่มีย่ออธิบายที่ชัดเจนว่า วิถี de novo ของการสังเคราะห์กรดไขมันมีส่วนเชื่อมโยงไปถึงการสังเคราะห์ PHA ได้อย่างไร จนกระทั่ง Rehm et al. (1998) ได้ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ transacylase ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน 3-hydroxyacyl-ACP ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ในวิถี de novo ของการสังเคราะห์กรดไขมัน ไปเป็น 3-hydroxyacyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์

PHA นั้นเอง จึงเรียกชื่อเอนไซม์ดังกล่าวว่า 3-hydroxyacyl-ACP; CoA transferase ใช้ตัวย่อว่า PhaG และการค้นพบนี้ทำให้ข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับการสังเคราะห์ PHA ผ่านวิถี *de novo* ของการสังเคราะห์กรดไขมันได้ข้อสรุปในที่สุด (รูปที่ 3 Pathway III)

สรุป

ความเข้าใจเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรียที่เรียบเรียงไว้ข้างต้น ถือเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาและปรับปรุงการผลิต PHA ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการเลือกแหล่งคาร์บอน และชนิดของแบคทีเรียที่เหมาะสม การพัฒนาเทคโนโลยีชีววิทยาในกำกับวิธิเมแทบอลิซึม รวมถึงการดัดแปลงวิธิเมแทบอลิซึมเพื่อทำให้แบคทีเรียสามารถผลิต PHA ชนิดที่ต้องการได้ในปริมาณที่สูงขึ้น เป็นต้น และจากรายละเอียดเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ของ PHA ในแบคทีเรียที่กล่าวมานั้น ยังช่วยให้สรุปได้ว่า วิถีชีวสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรียประกอบด้วยกระบวนการ 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการเตรียมหน่วยมอนอเมอร์ที่อยู่ในรูป (R)-3-Hydroxyacyl-CoA และส่วนที่ 2 ก็คือการสังเคราะห์ PHA จาก (R)-3-Hydroxyacyl-CoA โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase ซึ่งในส่วนของการเตรียม (R)-3-Hydroxyacyl-CoA ก็จะประกอบด้วยลำดับปฏิบัติการในการเปลี่ยนโมเลกุลของแหล่งคาร์บอนให้เป็น (R)-3-Hydroxyacyl-CoA ผ่านวิถีทางที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของแหล่งคาร์บอน และพื้นฐานทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแต่ละชนิด

อย่างไรก็ตาม นอกจากวิถีชีวสังเคราะห์ 3 วิถีที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว นักวิทยาศาสตร์ยังคงเชื่อว่าน่าจะมีวิถีชีวสังเคราะห์ PHA อื่นๆ อีกที่ยังไม่ถูกค้นพบ หรือยังไม่ได้มีการอธิบายอย่างถูกต้อง ดังนั้นในอนาคต การค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ ที่สามารถผลิต PHA ได้ ก็อาจนำไปสู่การค้นพบวิถีชีวสังเคราะห์ใหม่ๆ ด้วย เพราะเหตุนี้ จึงยังมีนักวิจัยหลายคณะ

ที่พยายามแสวงหาแบคทีเรียผู้ผลิต PHA ชนิดใหม่จากแหล่งธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง

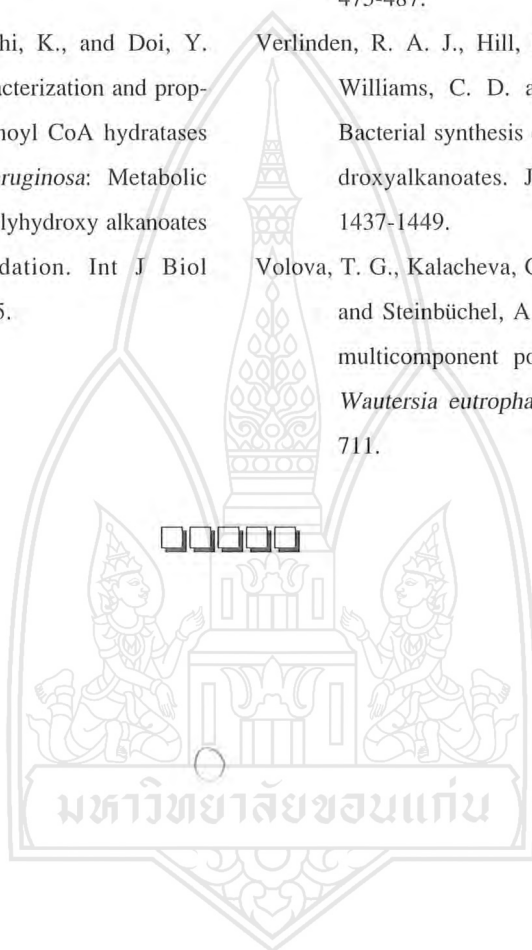
เอกสารอ้างอิง

- Amirul, A. A., Syairah, S. N., Yahya, A. R. M., Azizah, M. N. M. and Majid, M. I. A. (2007). Synthesis of biodegradable polyesters by gram negative bacterium isolated from Malaysian environment. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-007-9605-2.
- Bonatto, D., Matias, F., Lisboa, M. P., Bogdawa, H. M. and Henriques, J. A. P. (2004). Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain. *World J Microbiol Biotechnol.* 20: 395-403.
- Byrom, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* 5: 246-250.
- Cromwick, A. M., Foglia, T. and Lenz, R. W. (1996). The microbial production of poly (hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl Microbiol and Biotechnol.* 46(5-6): 464-469.
- Das, Q., Chowdhury, J. U. and Anwar, M. N. (2005). Isolation, purification and characterization of biodegradable polymer producing bacteria *Pseudomonas pseudomallei*. *Int J Agri Biol.* 7(1): 114-117.
- de Smet, M. J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J. and Wynberg, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* 154: 870-878.
- Füchtenbusch, B., Wüllbrandt, D. and Steinbüchel, A. (2000). Production of polyhydroxyalkanoic

- acids by *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas oleovorans* from an oil remaining from biotechnological rhamnose production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 167-172.
- Fukui, T. and Doi, Y. (1997). Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol.* 179(15): 4821-4830.
- Fukui, T., Shiomi, N. and Doi, Y. (1998). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol.* 180: 667-673.
- González-García, Y., Nungaray, J., Córdova, J., González-Reynoso, O., Koller, M., Atlic, A. and Braunege, G. (2008). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961. *J Ind Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s10295-007-0299-0.
- Haas, R., Jin, B. and Zepf, F. T. (2008). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(1): 253-256.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1989). The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett.* 57: 1-6.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L. and Dawes, E. A. (1988-I). Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett.* 52: 91-96.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L. and Dawes, E. A. (1988-II). The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3- hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett.* 52: 259-264.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Ewing, D. F. and Dawes, E. A. (1990). Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl Environ Microbiol.* 56(11): 3354-3359.
- Hori, K., Soga, K. and Doi, Y. (1994). Effects of culture conditions on molecular weights of poly (3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnol Lett.* 16(7): 709-714.
- Huijberts, G. N. M., de Rijk, T. C., de Waard, P., and Eggink, G. (1994). ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J Bacteriol.* 176: 1661-1666.
- Huijberts, G. N. M., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G. W. and Witholt, B. (1992). *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-Hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol.* 58(2): 536-544.
- Kalia, V. C., Bhattacharyya, A. and Rashmi G. (2003). Genomic databases yield novel bioplastic producers. *Nat Biotechnol.* 21: 845-846
- Lemoigne, M. (1926). Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide b-oxobutyrique. *Bull Soc Chem Biol.* 8: 770-782

- Madison, L. L. and Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(1): 21-53.
- Marsudi, S., Unno, H. and Hori, K. (2008). Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78: 955-961.
- Nubia, M., Ivonne, G., Dionisio, M., Victoria, G., Dolly, R., Diego, S., Juan, G., Fabio, A., Armando, E. and Dolly, M. (2007). Bioprospecting and characterization of poly-bhydroxyalkanoate (PHAs) producing bacteria isolated from Colombian sugarcane producing areas. *African J Biotechnol.* 6(13): 1536-1543.
- Pantazaki, A. A., Tambaka, M. G., Langlois, V., Guerin, P. and Kyriakidis, D. A. (2003). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase. *Mol Cell Biochem.* 254: 173-183.
- Peoples, O. P. and Sinskey, A. J. (1989). Poly-b-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16 - characterization of the genes encoding b-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J Biol Chem.* 264: 15293-15297.
- Peoples, O. P. and Sinskey, A. J. (1989). Poly-b-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16 - identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J Biol Chem.* 264: 15298-15303.
- Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J.* 376: 15-33.
- Rehm, B. H. A., Kruger, N., and Steinbüchel, A. (1998). A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The phaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. *J Biol Chem.* 273: 24044-24051.
- Schubert, P., Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G. (1988). Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 170: 5837-5847.
- Segura, D., Guzmán, J. and Espín, G. (2003). *Azotobacter vinelandii* mutants that over-produce poly-b-hydroxybutyrate or alginate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 159-163.
- Steinbüchel, A. (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom, D. (ed) *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Stockton, New York, p. 124.
- Steinbüchel, A. and Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 71: 81-123.
- Timm, A. and Steinbüchel, A. (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* 56: 3360-3367.
- Tsuge T., Yano K., Imazu S., Numata K., Kikkawa Y., Abe H., Taguchi K. and Doi Y. (2005). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromol Biosci.* 5: 112-117.

- Tsuge, T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G and Ishizaki, A. (2000). Molecular cloning of two (R)-specific enoyl CoA hydratases genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxy alkanoates synthesis. FEMS Microbiol Lett. 184: 193-198.
- Tsuge, T., Taguchi, S., Taguchi, K., and Doi, Y. (2003). Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: Metabolic tools for synthesis of polyhydroxy alkanoates via fatty acid β -oxidation. Int J Biol Macromol. 31: 195-205.
- Valappil, S. P., Peurism, D., Langley, G. J., Herniman, J. M., Boccaccini, A. R., Bucke, C. and Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. J Biotechnol. 127: 475-487.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D. and Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. J Appl Microbiol. 102: 1437-1449.
- Volova, T. G., Kalacheva, G. S., Kozhevnikov, I. V. and Steinbüchel, A. (2007). Biosynthesis of multicomponent polyhydroxyalkanoates by *Wautersia eutropha*. Microbiol. 76(6): 704-711.





ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากจุลินทรีย์

Factors Affecting the Production of Microbial Polyhydroxyalkanoate

ปิยะรัตน์ บุญแสวง¹

บทนำ

พลาสติกโดยทั่วไปเป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมี ได้มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายและเป็นสินค้าที่อำนวยความสะดวกให้กับคนในยุคปัจจุบันเป็นอย่างมาก แต่ปัญหาที่ตามมาคือ การสะสมของพลาสติกที่สะสมเพิ่มขึ้นและเป็นขยะที่ย่อยสลายได้ยากมาก ต้องใช้เวลายาวนานที่จะสลายได้หมด ดังนั้นการผลิตพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมี แต่มีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายหรือสลายตัวโดยวิธีธรรมชาติได้ หรือที่เรียกว่า พอลิเมอร์ชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมจากการใช้พลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีได้ ตัวอย่างวัสดุเหล่านี้ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA), พอลิแลคไทด์ (polylactide), พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นต้น (Lee, 1996)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เป็นพอลิเมอร์ชีวรูปที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติเทียบเคียงได้กับพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีน (Khanna and Srivastava, 2005) ซึ่งข้อดีของพอลิไฮดรอกซีอัลคา-

โนเอต คือ เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเคมี คือ ค่าใช้จ่ายในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพยังสูงกว่าการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเคมี โดยเฉพาะค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับวัตถุดิบประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์ (Lee, 1996; Choi and Lee, 1997) มีบทความที่ได้รวบรวมรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลทั่วไปและลักษณะของ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Lee, 1996; Sudesh et al., 2000; Luengo et al., 2003; Khanna and Srivastava, 2005) แต่มีเพียงไม่กี่บทความที่รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจะสามารถทำให้ควบคุมสภาวะในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ได้ผลผลิตมากที่สุด ดังนั้น วัตถุประสงค์หลักของบทความนี้เพื่อศึกษารวบรวมและวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและศักยภาพความเป็นไปได้ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากวัตถุดิบราคาถูกโดยเฉพาะจากของเสียหรือน้ำเสียจากจุลินทรีย์

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

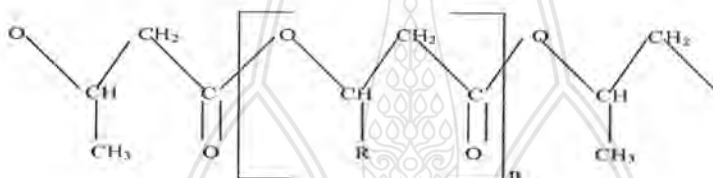
ชนิดต่างๆ ทั้งจุลินทรีย์บริสุทธิ์และกลุ่มของจุลินทรีย์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์และป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูลภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล เช่น ขาดแคลนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจน แต่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินไป (Satoh et al., 1998) เพื่อใช้เป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรีย

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตนั้นจะประกอบด้วยมอนอเมอร์ของกรดไฮดรอกซี (hydroxyl acid, HA) มากกว่า 80 ชนิด โดยจะมีคุณสมบัติเชิงกลแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของมอนอเมอร์ (Lee, 1996)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูปของกรดไขมัน R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β-hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทั่วไปดังรูปที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอยู่ในช่วง 200,000 - 3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh et al., 2000)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ที่มา : Khanna and Srivastava, 2005)

องค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีหน่วยย่อยของมอนอเมอร์ชนิดต่างๆ รวมกันเกิดเป็นสายพอลิเมอร์ยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนมอนอเมอร์ที่มาต่อรวมกัน (Doi, 1990) ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short chain length PHAs หรือ scl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอนไม่เกิน 5 อะตอม, พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง (medium chain length PHAs หรือ mcl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาว (long chain length PHAs หรือ lcl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอม โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้นจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุด ขณะที่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางจะมีคุณสมบัติเป็น elastomers และ ยาง (rubber) (Suriyamongkol

et al., 2007) นอกจากนี้ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น การเชื่อมต่อกันของกรดไขมันชนิดไฮดรอกซีบิวทีเรต (hydroxybutyrate, HB) ซึ่งมีหมู่เมทิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) โดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิโพรพิลีนหรือพอลิเอทิลีน ซึ่งสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ (Khanna and Srivastava, 2005) ขณะที่โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย

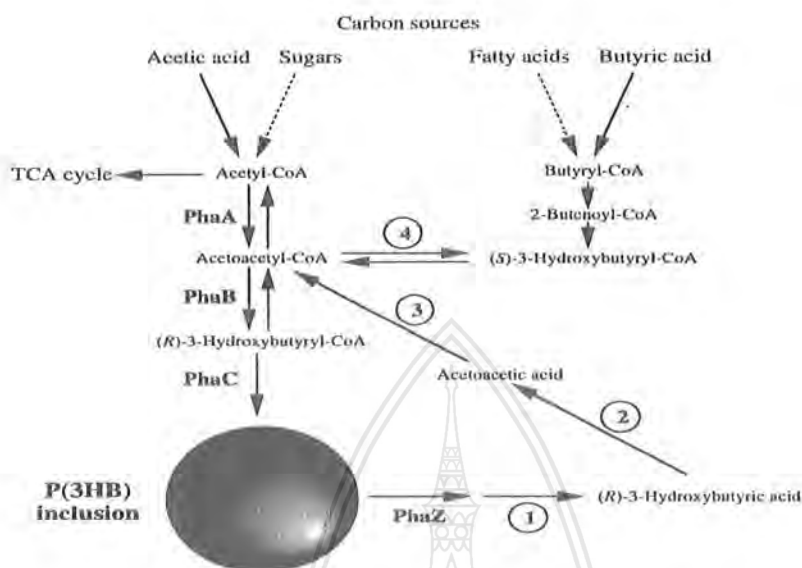
มอนอเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาลิเรต (poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่เป็นไฮดรอกซีบิวทิเรต (HB) และไฮดรอกซีวาลิเรต (hydroxyvalerate, HV) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่มและมีโอกาสเกิดได้สูงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะไฮดรอกซีวาลิเรต (HV) เกิดได้ตั้งแต่ 0-95 เปอร์เซ็นต์โมล ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น โดยสัดส่วนของไฮดรอกซีวาลิเรตยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น จุดหลอมเหลวลดลง มีความยืดหยุ่นและมีค่า elongation เพิ่มขึ้น ดังนั้น สามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสม (Khanna and Srivastava, 2005)

กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์

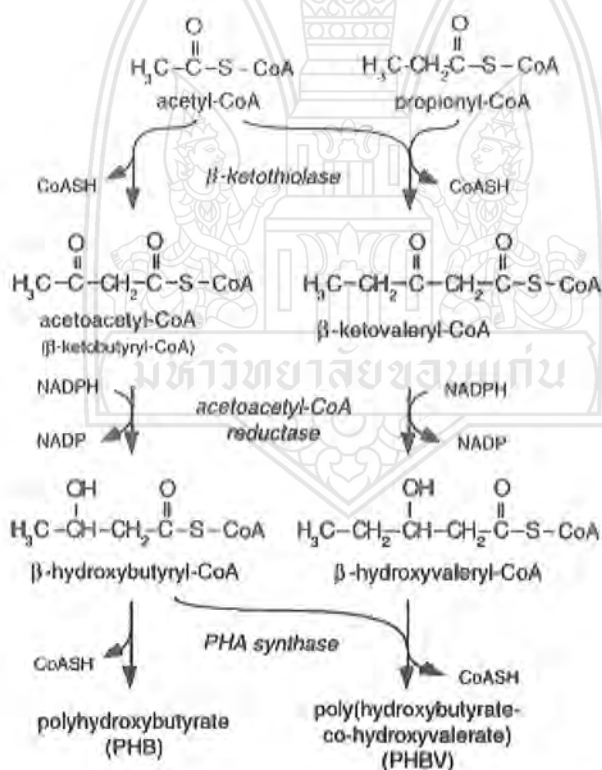
วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) การควบคุมการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์มีความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ซึ่งประกอบด้วยยีน *PhaA*, *PhaB* และ *PhaC* (รูปที่ 2) โดย *PhaA* ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้าคีโตไฮโดรเลส (β -ketothiolase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ไปเป็นอะซีโตอะซิติลโคเอ (acetoacetyl-CoA) สำหรับ *PhaB* ควบคุมการผลิตเอนไซม์อะซีโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-CoA reductase) ซึ่งทำการเปลี่ยนอะซีโตอะซิติลโคเอให้เป็น อาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิрилโคเอ (R-3-hydroxybutyryl-CoA) และสำหรับ *PhaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ซินเทส (PHA synthase) โดยสังเคราะห์พอลิเมอร์จากอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิрилโคเอ ไปเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Sudesh et al., 2000; Luengo et al., 2003; Suriyamongkol et al., 2007) ส่วน *PhaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของเกรนูลของพอลิไฮดรอกซี-

อัลคานอยด์ ได้แก่ โปรตีนฟาซิน (phasin) ซึ่งเป็นโปรตีนมวลโมเลกุลต่ำ มีหน้าที่ส่งเสริมการผลิต การจับกับเกรนูลเพื่อทำการควบคุมขนาดจำนวน และพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาดและจำนวนของพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ยังขึ้นกับปริมาณของ *PhaC* ที่มีอยู่ในเซลล์อีกด้วย และยังมี *PhaZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (depolymerase) เพื่อใช้ปลดปล่อยมอนอเมอร์ออกจากพอลิเมอร์ โดยเอนไซม์ที่ *PhaZ* ผลิตออกมาจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานได้ด้วย PHB และสารกระตุ้น เช่น ทริปซิน จึงตั้งข้อสังเกตว่า *PhaZ* อาจจะทำหน้าที่เป็นโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือการสลายเกรนูลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยดีพอลิเมอร์เรสต้องอาศัยเอนไซม์ proteolytic enzyme อื่นร่วมด้วย (Luengo et al., 2003)

สำหรับกระบวนการเกิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคพอลิเมอร์ไฮดรอกซีวาลิเรต แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ เช่น การเติมกรดไพรูวิก กรดวาลิริก หรือกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้นๆ ที่มีจำนวนคาร์บอนเลขคู่เพื่อผลิตสารตัวกลางที่สำคัญ คือ ไพโรฟิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) ในอาหารกลูโคส กระบวนการเกิดไพโรฟิโอนิลโคเอต้องอาศัยกลุ่มเอนไซม์หลายชนิด เช่น α -ketoacid oxidative dehydrogenase complex (BCKD), α -ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) และ pyruvate dehydrogenase complex (PD) (Eschenlauer et al., 1996)



รูปที่ 2 วิธีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย (ที่มา : Sudesh et al., 2000)

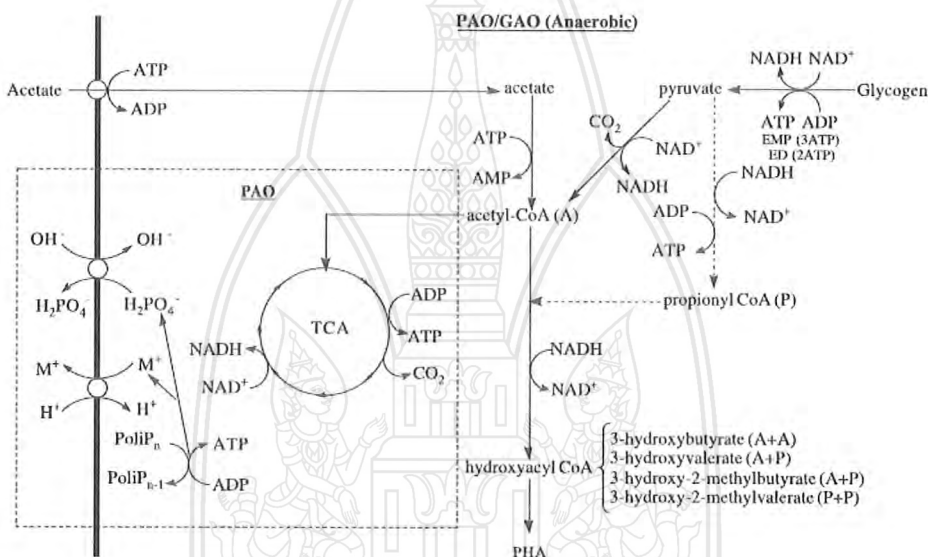


รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV (ที่มา : Eschenlauer et al., 1996)

กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถผลิตได้ในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ-ให้อากาศ โดยมีจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่สามารถสะสมแหล่งคาร์บอนในสภาวะไร้อากาศ คือ จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (polyphosphate-accumulating organisms, PAOs) และสะสมไกลโคเจน (glycogen-accumulating organisms, GAOs) ในสภาวะไร้อากาศ จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟตจะใช้พอลิฟอสเฟต

เป็นแหล่งพลังงานและไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอน ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดสะสมไกลโคเจนจะใช้ไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอนในการรับสารอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันระเหยง่ายมาเก็บสะสมไว้ในรูปของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยที่กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถใช้อะซิเตทเพื่อเปลี่ยนไปเป็นอะซิติดิลโคเอ สำหรับใช้ในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (ดังรูปที่ 4) (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004)



รูปที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดย PAO/GAO (ที่มา : Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของจุลินทรีย์

การผลิตพอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีดังนี้

1. ชนิดของจุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน

ชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตส่งผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตพอลิเมอร์ในรูปไฮโปพอลิเมอร์ ในขณะที่จุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ เช่น เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* R3 พบว่า มีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *A. eutrophus*

ATCC17697 พบว่า มีการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณและองค์ประกอบที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ โดยการ over expression ของ ยีน *Pha* ชนิดต่างๆ เช่น recombinant *E. coli* จากการตัดต่อยีน *PhaC* ของ *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อเกิดการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง เป็นต้น (Suriyamongkol et al., 2007) นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่ใช้กลุ่มจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ปีวรา บุตรวงศ์, 2546; Dionisi et al., 2005; Kasemsap and Wantawin, 2007) พบว่า การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของกลุ่มจุลินทรีย์มักเกิดในกระบวนการแอนแอโรบิก-แอโรบิก ของระบบบำบัดน้ำเสีย ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด (2551) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง sequencing batch reactor (SBR) โรงงานปลาทุ่นำกระป๋อง พบว่า ได้จุลินทรีย์ 4 ไอโซเลท และเมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค 16s rRNA สามารถจำแนกได้เป็น *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter* spp. และ *Acinetobacter baumannii* Alias and Tan (2005) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่า สามารถแยกเชื้อได้ 45 ไอโซเลท แต่มีเพียง 10 ไอโซเลท ที่สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยไอโซเลท FLP1 สามารถเจริญได้ดีและใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เมื่อนำไปบ่งชี้โดยวิธี BIOLOG พบว่า สามารถจำแนกได้ว่าเป็น *Burkholderia cepacia*

2. แหล่งคาร์บอน

ในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้และใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยที่แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้สังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส กรดซิตริก อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต แลคเตท เป็นต้น นอกจากนี้ ยังสามารถใช้ไขมันซึ่งเป็นวัตถุดิบได้หลายชนิด (ตารางที่ 1) คาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้มีผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้ ดังนั้น ในการผลิตจึงต้องศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากงานวิจัยของ Lemos et al. (2006) ศึกษาการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่งระบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์ เปรียบเทียบระหว่างการเติมอะซิเตทและโพรพิโอเนตในอาหารสังเคราะห์ พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเลี้ยงโดยเติมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนให้โฮโมพอลิเมอร์ชนิด HB ส่วนกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงโดยเติมโพรพิโอเนตให้โคพอลิเมอร์ชนิด HB และ HV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนอะซิเตตร่วมกับโพรพิโอเนตจะได้โคพอลิเมอร์ คือ HB, HV และ HMV (hydroxyl-methylvalerate) แต่ผลผลิตและอัตราการผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากการใช้อะซิเตทเป็นสารอาหารจะสูงกว่าการใช้โพรพิโอเนต ทั้งนี้ เนื่องจากอะซิเตทประกอบด้วยคาร์บอนสายสั้นกว่าทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ จากงานวิจัยของ Wang et al. (2007) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ของเชื้อผสมจากตะกอนเร่งที่เลี้ยงในของเสียจากมอลต์ (malt waste) และของเสียจากถั่วเหลือง (soya waste) พบว่า องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25 % โมล ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้พอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของ HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80 % โมล ตามลำดับ

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด (2551) ศึกษาการเติมกรดโพรพิโอนิกและกรดวาลิริกในน้ำเสียโรงงานปลา

พื้หน้ากระป๋องโดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achmobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achmobacter* spp. PSU-M ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า การใช้กรควาลิรีกให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าการใช้กรคโพรพิโอนิก นอกจากนี้ ยังได้เปรียบเทียบการใช้กรควาลิรีกความเข้มข้น 0-180 มิลลิโมลาร์

พบว่า ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์จะให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงที่สุด เท่ากับ 45.2 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 140 และ 180 มิลลิโมลาร์ จะให้ปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่าและให้ความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตน้อยมาก

ตารางที่ 1 การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สารอาหารตั้งต้น	PHA (g/l)	PHA (%w/w)	องค์ประกอบของ PHA (%โมล)		อ้างอิง
				HB	HV	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	น้ำเสียโรงงานแป้ง (Acetic 60-80%, Propionic 10-30%, Butyric 5-40%)	1.2	34	NR	38	Yu (2001)
<i>Azotobacter chroococcum</i> H23	อาหารสังเคราะห์ (น้ำเสียจาก olive oil mill 60% + ammonium acetate 0.12%+valerate 40 mM)	4.7	88	NR	24	Pozo et al. (2002)
<i>A. latus</i> DSM1122	Soya waste	NR	NR	100	0	Wang et al.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Soya waste	NR	NR	100	0	(2007)
<i>Klebsiella</i> spp.	Soya waste	NR	NR	79	21	
<i>Cupriavidus nrcator</i> H16	Crude palm oil 5 g/l	3.5	75	100	0	Lee et al.
	Crude palm oil 5 g/l + propionate 5 g/l	NR	74	97	3	(2008)
	Crude palm oil 5 g/l + valerate 5 g/l	NR	64	94	6	
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	Hydrolyzed whey permeate (glucose + galactose + valerate)	1.44	12	79	21	Koller et al. (2008)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 14F	Fructose 20 g/l + Glutamate 9 g/l	3.5	60	> 97	< 3	Lomungruang et al. (2006)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Acid from palm oil fiber fermentation + Propionic 2.5 g/l + Butyric 6.5 g/l	2.6	58	82	18	ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550)
Activated sludge	Acetate 0.6 g/l	NR	51	NR	NR	Kasemsap and Wantawin (2007)

NR = not reported

3. แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เลซีน เปปโตน และยีสต์สกัด รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แกลือแอมโมเนียม (NH₄⁺)

ต่างๆ จุลินทรีย์จะสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด กล่าวคืออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูง อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณ

สารอาหารในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกขึ้นทางพันธุกรรม (Lee, 1996)

Grothe et al. (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร (โมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจน เท่ากับ 28.3) มีผลให้มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร จากงานวิจัยของ Kumar et al. (2004) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลุ่มจุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24 96 120 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุด เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Wang et al. (2007) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20 40 60 80 100 120 และ 140 (โมลต่อโมล) เมื่อใช้ตะกอนสลัดจ์ในระบบ SBR และใช้บิวทิริกและวาเอร์ริกเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 100 ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมากที่สุด ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 30.3 กรัมต่อกรัมเซลล์

4. แหล่งฟอสฟอรัสและอาหารเสริมเกลือแร่
จุลินทรีย์จะสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสถานะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอ แต่มีปริมาณฟอสฟอรัสและธาตุอาหาร

รองค่อนข้างจำกัด Grothe et al. (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารรอง ต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Alcaligenes latus* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเติมธาตุอาหารรอง ได้แก่ $ZnSO_4$ $CuSO_4$ $NiSO_4$ $CaCl_2$ H_3BO_3 Na_2MoO_4 $CoCl_2$ $MnCl_2$ และ Ammonium Fe (III) citrate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Ryu et al. (1997) ได้ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นเริ่มต้น KH_2PO_4 เท่ากับ 2.2 3.1 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นของเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุด เท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใน 74 ชั่วโมง จากการทดลองของธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มซึ่งมีฟอสเฟตอยู่ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่า การเติม KH_2PO_4 เพิ่มเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้เกิดการสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเพิ่มขึ้น

5. ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซีเตรทซินเทสและไอโซซีเตรทดีไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติกโคเอยม์ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโอะซิติกโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยเอนไซม์เบต้าดีไฮโดรโอเลส (Luengo et al., 2003) จากการศึกษาของ Satoh et al.

(1998) เลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง 2 แบบ Anaerobic - Aerobic (AA) และ Microanaerobic - Aerobic (MA) แล้วนำสลัดจ์จากทั้ง 2 ระบบมาทดสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ ไม่มีการเติมออกซิเจน และแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่า สลัดจ์จากระบบ AA มีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสลัดจ์จากระบบ MA สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองของธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 พบว่าการให้อากาศที่ 2 ปริมาตรต่อปริมาตรตอนาที (vvm) ทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่า แต่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรตอนาที (vvm)

6. พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า หากต้องการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป (Kinoshita et al., 1991) ในสภาวะที่พีเอชต่ำจะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli and Strohl, 1990) การปรับพีเอชเป็น 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดงประจุเป็นบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ (Du et al., 2001) จากรายงานของ Kasemsap and Wantawin (2007) ศึกษาผลของ

พีเอชต่อศักยภาพในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้ชุดทดลองในสภาวะไร้อากาศและใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร เปรียบเทียบการสะสม PHA จากสลัดจ์ส่วนเกิน 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่มีปริมาณพอลิฟอสเฟตในเซลล์เท่ากับ 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, ปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์เท่ากับ 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่า การสลายสารที่เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ ไกลโคเจนและพอลิฟอสเฟตที่ค่าพีเอช 6 จะน้อยที่สุด และมากขึ้นตามลำดับเมื่อพีเอชสูงขึ้น มีผลทำให้มีการสะสม PHA ที่พีเอช 6 มากที่สุด คือ 17 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ในรูปคาร์บอนสำหรับ RP5 และ RP15 ตามลำดับ แต่การใช้พลังงานมากขึ้น และเป็นพลังงานจากการสลายไกลโคเจนในการสังเคราะห์อาหารเข้าสู่เซลล์ที่พีเอชสูงขึ้นมีผลให้สัดส่วน HV ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกประเภทนี้มีค่าสูงขึ้น ดังนั้น สลัดจ์ RP5 จะมีสัดส่วน HV/PHA ที่พีเอช 8 สูงกว่าที่สะสมที่พีเอช 6 แต่สัดส่วนดังกล่าวค่อนข้างคงที่สำหรับ RP15 และจากงานวิจัยของ ศิริวรรณ ระเด่นอำมหิต (2551) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์ผสมของ *Achmobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achmobacter* spp. PSU-M และงานวิจัยของเขมรัฐ เขมวงศ์ (2550) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจาก *Rhodobacter sphaeroides* U7 พบว่า การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 จะทำให้มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยมาก ขณะที่การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 จะทำให้มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ใกล้เคียงกัน

7. อุณหภูมิ

Aslim et al. (1998) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม lactic acid bacteria พบว่า อุณหภูมิที่จีโนส *Lactobacillus* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่จีโนส *Pediococcus* เจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ *Streptococcus* เจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่โสภานินเวทิกิจวานิชย์ (2547) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ

ต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียอุณหภูมิต่ำที่ไหลลงได้แก่ 10 20 และ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการผลิตและผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต อย่างเห็นได้ชัด คือ อัตราการผลิตและผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ โดยชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสกับการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน มีค่าสัดส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในระบบ คือ 2,830 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะฟอสฟอรัสที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเข้มข้นของระบบ คือ 1,491 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในการทดลองที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเท่ากับ 2,133 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารอ้างอิง

เขมรัฐ เขมวงศ์. (2550). การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธงชัย วงศ์สุวรรณ. (2550). การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปวีรา บุตรวงศ์. (2546). การสังเคราะห์ PHA จากกระบวนการแอนแอโรบิก-แอโรบิกแอก

ทีเวเต็ดสลัดจ์ที่ใช้บำบัดน้ำเสียต่างชนิด. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. (2551). สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเลโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากระบบเอสบีอาร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. (2547). อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตพีเอชเอเชื้อผสมโดยน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Alias, Z. and Tan, I. K. P. (2005). Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technol.* 96: 1229-1234.

Anderson, A. J. and Wynn, J. P. (1995). Microbial Polyhydroxyalkanoates, Polysaccharides and Lipids. *In Basic Biotechnology*. 2nd ed. (Ratledge, C. and Kristion, B., eds.). Cambridge: Cambridge University Press. pp. 325- 333.

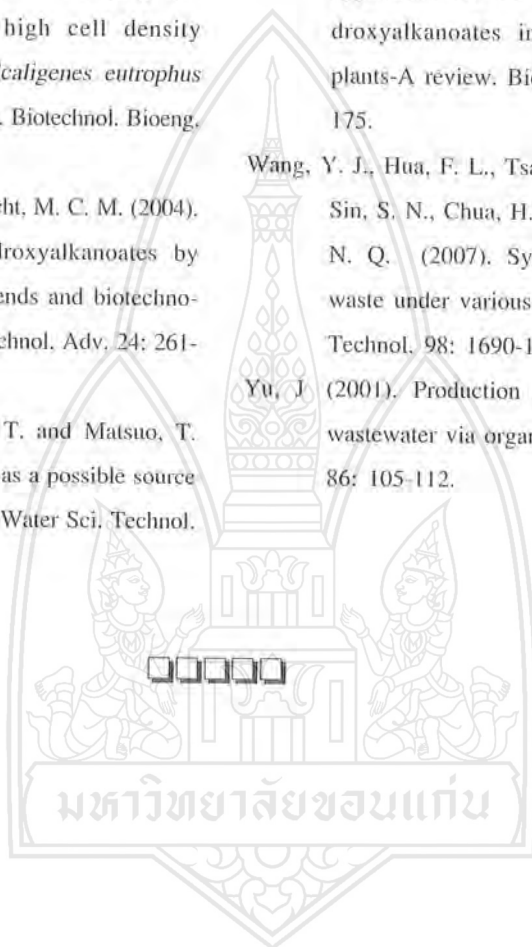
Aslim, A., Caliskan, F., Beyath, Y., and Gunduz, U. (1998). Poly- β -hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 159: 293-297.

Choi, J. and Lee, S.Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17: 335-342.

Dionisi, D., Carucci, G., Petrangeli Papini, M., Riccardi, C., Majone, M. and Carrasc, F. (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39: 2076-2084.

- Doi, Y. 1990. Microbial Polyester. New York: VCH. p. 156.
- Du, G., Si, Y. and Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxy-alkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. Biotechnol. Lett. 23: 1613-1617.
- Eschenlauer, A. C., Stoup, S.K. Srienice, F. and Somers, D.A. (1996). Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source. Int. J. Biol Macromol. 19: 121-130.
- Grothe, E., Moo-Young, M. and Christi, Y. (1999). Fermentation optimization for production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme Microb. Technol. 25: 132-141.
- Kasemsap, C. and Wantawin, C. (2007). Batch production of polyhydroxyalkanoate by low polyphosphate content activated sludge at varying pH. Bioresource Technol. 98: 1020-1027
- Khanna, S. and Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochem. 40: 607-619.
- Kinoshita, S., Kulprecha, K. and Chao, A. (1991). Microbial Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid. In Annual Report of IC Biotech (Oshima, Y.,ed). Osaka: Osaka University. pp. 347-349.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E. G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P. and Braunegg, G. (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovor*. Bioresource Technol. 99: 4854-4863.
- Kumar, M. S., Mudliar, S. N., Reddy, K. M. K. and Chakrabarti, T. (2004). Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. Bioresource Technol. 95: 327-330.
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49: 1 -14.
- Lee, W-H., Loo, C-Y., Nomura, C. T. and Sudesh, K. (2008). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. Bioresource Technol. 99: 6844-6851.
- Lemos, P. C., Serafim, L. S. and Reis, M.A.M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. J. Biotechnol. 122: 226-238.
- Lorrunguang, C., Martthong, J., Sasaki, K. and Noparatnaraporn, N. (2006). Selection of photosynthetic bacterium *Rhodospira rubra* 14F for polyhydroxyalkanoate production with two-stage aerobic dark cultivation. J. Biosci. Bioeng. 102: 128-131.
- Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Noharro, G. and Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin Microbiol. 6: 256-260.
- Luli, G. W. and Strohl, W. R. (1990). Comparison of Growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1004-1011.
- Pozo, C., Martinez-Toledo, M. V., Rodelas, B. and Gonzalez-Lopez, J. (2002). Effect of culture conditions on the production of

- polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J. Biotechnol.* 97: 125-131.
- Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K. and Chang, H. N. (1997). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 28-32.
- Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 24: 261-279.
- Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T. and Matsuo, T. (1998). Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Sci. Technol.* 38: 103-109.
- Sudesh, H., Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates : biological polyesters. *Prog. in Polym. Sci.* 25: 1503 -1555.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants-A review. *Biotechnol. Adv.* 25: 148-175.
- Wang, Y. J., Hua, F. L., Tsang, Y. F., Chan, S. Y., Sin, S. N., Chua, H., Yu, P. H. F. and Ren, N. Q. (2007). Synthesis of PHAs from waste under various C:N ratio. *Bioresource Technol.* 98: 1690-1693.
- Yu, J. (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *J. Biotechnol.* 86: 105-112.





การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพพุลลูแลนและการประยุกต์ใช้

Production of Pullulan Biopolymer and its Applications

สีหนาท ประสงค์สุข¹

บทนำ

พอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) คือ พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติซึ่งผลิตขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียและรา พอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์นั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถควบคุมภาวะการผลิตได้ง่ายในห้องปฏิบัติการและมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ตัวอย่างของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย เช่น แซนแทน (xanthan) ซัคซิโนไกลแคน (succinoglycan) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นต้น ในขณะที่พอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรานั้นยังมีการศึกษาวิจัยไม่มากนัก พอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจเนื่องจากว่ามีประโยชน์เชิงเทคโนโลยีชีวภาพและยังเป็นที่รู้จักกันน้อยในประเทศไทย คือ พุลลูแลน (pullulan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้จากยีสต์ ในบทความนี้จะกล่าวถึงพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดนี้ รวมถึงการผลิตและการประยุกต์ใช้พุลลูแลนเพื่อประโยชน์ในด้านต่างๆ

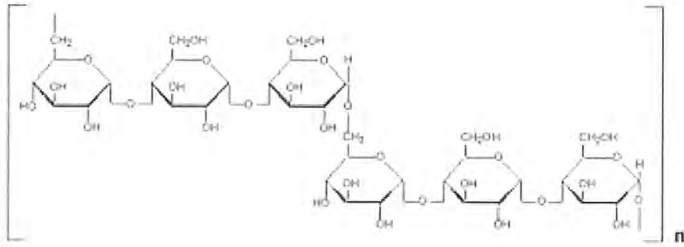
พอลิเมอร์ชีวภาพพุลลูแลน

พุลลูแลนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium*

pullulans (Leathers, 2003) พุลลูแลนเริ่มเป็นที่รู้จักครั้งแรกจากการสังเกตพบการสร้างพอลิเมอร์ภายนอกเซลล์ ในขณะที่มีการเพาะเลี้ยง *Dermatium pullulans* (ชื่อเดิมของ *A. pullulans*) (Bauer, 1938) ต่อมา Bernier (1958) ได้คัดแยกและศึกษาถึงลักษณะสมบัติของพอลิเมอร์ดังกล่าวและตั้งชื่อว่า “พุลลูแลน” ซึ่งเป็นที่มาของชื่อชนิด (specific epithet) ของยีสต์ชนิดนี้ หลังจากนั้นได้มีการศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านถึงโครงสร้างพื้นฐานของพุลลูแลนและสรุปว่า พุลลูแลนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายโมเลกุล หรือ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีโครงสร้างเป็นสายตรง (linear) ของน้ำตาลกลูโคส โดยหน่วยย่อยของพุลลูแลนคือน้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) หรือน้ำตาลกลูโคส 3 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก (α -1,6-glycosidic linkage) (รูปที่ 1) นอกจากนั้น Catley et al. (1966) ยังพบว่า โครงสร้างของพุลลูแลนนั้นมีน้ำตาลมอลโตเตตราโอส (maltotetraose) หรือน้ำตาลกลูโคส 4 โมเลกุล อยู่ในโมเลกุลของพุลลูแลนด้วย โดยมีอยู่ในปริมาณน้อยและอยู่อย่างสุ่มในโครงสร้าง

กระบวนการสังเคราะห์พุลลูแลนโดย *A. pullulans* นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด โดย Ueda and Kono (1965) ได้กล่าวถึงการสังเคราะห์พุลลูแลนว่าเกี่ยวข้องกับ

¹ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของพุลลูแลน (<http://www.hayashibara-intl.com/food/pullulan.html>)

กับการใช้ UDP-glucose ซึ่งต้องอาศัยพลังงาน คือ ATP ในการสังเคราะห์และใช้สารตัวกลางที่เป็นไขมัน มาเกี่ยวข้องด้วย การสังเคราะห์พุลลูแลนจะเกิดขึ้นภายในเซลล์และหลั่งออกมาภายนอกของเซลล์ยีสต์ ซึ่งต่างจากพอลิเมอร์ชีวภาพบางชนิด เช่น เด็กซ์แทรน (dextrans) ที่มีการหลั่งเอนไซม์กลูแคนซูเครส (glucan-sucrases) ออกมานอกเซลล์ ปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์พุลลูแลนแต่อย่างใด

การผลิตพุลลูแลน

การผลิตพุลลูแลนทางการค้าเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1976 โดยบริษัทฮาชิบารา (Hayashibara Company) ในเมืองโอคายามา ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้วัตถุดิบเป็นน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง (starch syrup) มีการจำหน่ายพุลลูแลนทั้งในรูปแบบที่เป็นแผ่นฟิล์มและลักษณะที่มีการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ กระบวนการผลิตพุลลูแลนในอุตสาหกรรมจะใช้วัตถุดิบเป็นน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยสลายแป้งความเข้มข้น 10-15% (Tsujisaka and Mitsuhashi, 1993) ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีองค์ประกอบอื่น ได้แก่ เปปโตเน ฟอสเฟต และเกลือชนิดต่างๆ โดยมีการปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้นที่ 6.5 ภายหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงถึงประมาณ 3.5 ภายใน 24 ชั่วโมง การเจริญสูงสุดของยีสต์จะอยู่ที่ 75 ชั่วโมง และปริมาณผลผลิตพุลลูแลนสูงสุดอยู่ที่ 100 ชั่วโมง

A. pullulans เป็นยีสต์ชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มแอสโคไมซีตัสยีสต์ (Ascomycetous yeast) มีชื่อเดิม

ว่า *Dermatium pullulans* และ *Pullularia pullulans* (Yurlova et al., 1999) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” หรือ “black yeast” เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้สามารถผลิตเม็ดสีดำของเมลานิน (melanin) ออกมาได้ ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะสีดำ (รูปที่ 2) ซึ่งเมลานินนี้เป็นปัญหาต่อการผลิตพุลลูแลนโดยจะปนเปื้อนในระหว่างการผลิต ทำให้ต้องทำการกำจัดออก ซึ่งในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะใช้ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ในการกำจัดสีเมลานินออก



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ *A. pullulans*

นอกจากยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* แล้วยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถผลิตพุลลูแลนได้เช่นกัน เช่น ราสายพันธุ์ต่าง ๆ อาทิ รา *Tremella mesenterica* (Fraser and Jennings, 1971) รา *Cytaria hariatii* และ *C. darwinii* (Waksman et al., 1977; Oliva et al., 1986) และ *Cryphonectria parasitica* (Corsaro et al., 1998) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึงแอลฟา-กลูแคน (α -glucan) ที่ผลิตโดยรา *Teloschistes flavicans* และพบว่าเป็น

พุลูลแลนที่เหมือนกับพุลูลแลนที่ได้จาก *A. pullulans* *T. mesenterica* และ *C. haritotii* แต่มีความแตกต่างกันในสัดส่วนของพันธะไกลโคซิดิกในโมเลกุล (Reis et al., 2002) โดยอัตราส่วนของแอลฟา-1,4 (α -1,4)

และแอลฟา-1,6 (α -1,6) ของพุลูลแลนจาก *A. pullulans* จะเป็น 2:1 แต่ถ้าพุลูลแลนจากสายพันธุ์อื่นอัตราส่วนจะเป็น 1:1 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพุลูลแลน

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Bauer, 1938 ; Leathers, 2003
<i>Tremella mesenterica</i>	Fraser and Jennings (1971)
<i>Cytaria harioti</i>	Waksman et al., 1977 ; Oliva et al., 1986
<i>Cytaria darwinii</i>	Waksman et al., 1977 ; Oliva et al., 1986
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Corsaro et al. (1998)
<i>Teloschistes flavicans</i>	Reis et al. (2002)

นอกจาก *A. pullulans* จะสามารถผลิตพุลูลแลนได้แล้ว ยีสต์ชนิดนี้ยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์อีกชนิดหนึ่งมีชื่อว่า ออบาซิเดน (*aubasidan*) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแตกต่างจากพุลูลแลน โดยเป็นกลูแคนที่มีพันธะแอลฟา-1,4- (α -1,4) เบต้า-1,6 (β -1,6) และ เบต้า-1,3 (β -1,3) อยู่ในโมเลกุล (Yurlova and De Hoog, 1997) โดยสายพันธุ์ *A. pullulans* ที่สามารถผลิตออบาซิเดนคือ *A. pullulans* var. *aubasidani*

การผลิตพุลูลแลนโดย *A. pullulans* นั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตที่มีการศึกษาวิจัยกันมากคือ ภาวะการหมักเพื่อการผลิตพุลูลแลน เช่น แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น รวมถึงสายพันธุ์ *A. pullulans* ที่ใช้ในการผลิต งานวิจัยเริ่มแรกโดย Catley (1971) ได้ทดลองใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดต่างๆ ในการผลิตพุลูลแลนจาก *P. pullulans* QM 3092 พบว่า ซูโครสให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด (14.8 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพุลูลแลนจากสายพันธุ์อื่น เช่น *A. pullulans* P56 (ผลิตพุลูลแลน

0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) (Schuster et al., 1993) *A. pullulans* Y2311-1 (ผลิตพุลูลแลน 26.2 กรัมต่อลิตร) (Gibson and Coughlin, 2002) *A. pullulans* ATCC 42023 (ผลิตพุลูลแลน 7 กรัมต่อลิตร) (West and Reed-Hamer, 1991) *A. pullulans* NRRL Y-6220 (ผลิตพุลูลแลน 41.9 กรัมต่อลิตร) (Badr-Eldin et al., 1994) อย่างไรก็ตาม แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นก็พบว่ามีความเหมาะสมกับการผลิตพุลูลแลนเช่นกัน เช่น ในกรณีของ *A. pullulans* Y-12,996 สามารถผลิตพุลูลแลนได้สูงสุด 10.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด (Leathers et al., 1988) Punnapayak et al. (2003) รายงานว่ายีสต์ *A. pullulans* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย 3 สายพันธุ์สามารถผลิตพุลูลแลนได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ผลิตพุลูลแลน 26.2 กรัมต่อกรัมคาร์บอน) จะเห็นได้ว่าอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตพุลูลแลนนั้นจะเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ *A. pullulans* ที่ใช้ในการผลิตด้วย แหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่มีราคาถูกก็เป็นทางเลือกสำหรับการใช้ในการผลิตพุลูลแลน อาทิเช่น น้ำเสียจากโรงงานแป้ง (69 กรัมต่อลิตร) (Barnett

et al., 1999) ถากน้ำตาลจากบีทรูท (24 กรัมต่อลิตร) (Lazaridou et al., 2002) เป็นต้น

แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการศึกษาในการผลิตพุลูลแลนมีทั้งที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และอนินทรีย์ West and Reed-Hamer (1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตพุลูลแลนจาก *A. pullulans* ATCC 42023 ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรด (ammonium nitrate) แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) แอมโมเนียมทาเทรต (ammonium tartrate) โซเดียมไนเตรด (sodium nitrate) แอสปาราจีน (asparagine) และยูเรีย (urea) และพบว่าแอมโมเนียมทาเทรตให้ผลผลิตพุลูลแลนสูงสุดที่ 10.05 กรัมต่อลิตร ขณะที่แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อน เช่น ทริปโตเน (tryptone) เปปโตเน (peptone) ซอยโตเน (soytone) และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ให้ผลผลิตพุลูลแลนที่สูงกว่าในสายพันธุ์เดียวกันนี้โดยซอยโตเนให้ผลผลิตพุลูลแลนสูงสุดที่ 14.38 กรัมต่อลิตร (Reed-Hamer and West, 1994) เมื่อใช้ *A. pullulans* สายพันธุ์อื่นในการผลิต ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพุลูลแลนก็แตกต่างกันไป เช่น *A. pullulans* M-u 1 ให้ผลผลิตพุลูลแลนสูงสุดในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต (12.2 กรัมต่อลิตร) (Tarabasz-Szymanska et al., 1999) ขณะที่ *A. pullulans* NRM2 ซึ่งคัดแยกได้ในประเทศไทย สามารถใช้เปปโตเนได้ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมไนเตรด โดยให้ผลผลิตสูงสุดที่ 25.1 กรัมต่อลิตร (Prasongsuk et al., 2007) เป็นต้น จากตัวอย่างก็จะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตก็เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเช่นเดียวกัน

ปัญหาที่พบในการผลิตพุลูลแลนนั้นมาจากเชื้อยีสต์ที่ใช้เนื่องจากในอุตสาหกรรมยังใช้เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการผลิตเมดิคัสีแลนิน ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการกำจัดเมลานินที่ปนเปื้อนในขณะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ในประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศไทย มีการค้นพบเชื้อยีสต์ชนิดนี้ที่มีสีแตกต่างกันไปเรียกสายพันธุ์เหล่านี้ว่า “Color

variant” คือเป็นเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเมดิคัสีแลนินที่ไม่ใช่สีดำ ทำให้โคโลนีที่มองเห็นไม่เป็นสีดำ (Prasongsuk et al., 2005) และเมื่อนำเชื้อเหล่านี้ที่คัดแยกได้มาผลิตพอลิเมอร์ ก็พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้เป็นพุลูลแลน มีผลผลิตค่อนข้างสูง (25.1 กรัมต่อลิตร) และไม่มีการปนเปื้อนของเมลานิน (Prasongsuk et al., 2007) การค้นพบนี้มีผลให้ลดขั้นตอนในการกำจัดเมลานินทำให้มีส่วนช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ ปัญหาอีกอย่างหนึ่งที่พบในการผลิตพุลูลแลน คือ เอนไซม์ที่เชื้อชนิดนี้สร้างขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์อะไมเลส (amylase) มีรายงานว่า เชื้อ *A. pullulans* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในช่วงที่มีการผลิตพุลูลแลน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของพุลูลแลนที่ผลิตได้เนื่องจากโครงสร้างของพุลูลแลนนี้นมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของอะไมโลส (amylose) ในแป้ง ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยพุลูลแลนได้ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพุลูลแลน การย่อยสลายของเอนไซม์อะไมเลสจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของพุลูลแลนลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของพุลูลแลน (Leathers, 2003; Prasongsuk et al., 2007) ดังนั้น ถ้าต้องการให้ได้พุลูลแลนที่มีคุณภาพดีขึ้น อาจใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หรือการกลายพันธุ์ (mutation) ในการทำให้เชื้อ *A. pullulans* นั้นไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในระหว่างการผลิตพุลูลแลน

ปัจจุบันปริมาณการผลิตพุลูลแลนทางการค้าในรูปผงและแคปซูลของบริษัท ฮายาชิบารา ประเทศญี่ปุ่น มีประมาณ 300 ตันต่อปี โดยราคาขายของพุลูลแลนสำหรับใช้ในอาหารอยู่ที่ 20 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม ส่วนพุลูลแลนสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมยามีราคาประมาณ 25 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม (Leathers, 2003)

คุณสมบัติของพุลูลแลนและการนำไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากโครงสร้างของพุลูลแลนที่มีพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิกเป็นองค์ประกอบ ทำให้มีผล

ต่อการขึ้นแผ่นฟิล์มและเส้นใยของพอลิเมอร์ชนิดนี้แผ่นฟิล์มและเส้นใยของพอลูลูแลนนั้นมีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกสังเคราะห์

แม้ว่าพอลูลูแลนจะมีราคาสูงกว่าพลาสติกทั่วไป แต่มีข้อดี คือ สามารถที่จะรับประทานได้และย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ พอลูลูแลนที่จำหน่ายทางการค้าจะมีลักษณะเป็นผงสีขาว สามารถละลายน้ำได้อย่างรวดเร็วทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ไม่มีความเป็นพิษ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและรส (Yuen, 1974) พอลูลูแลนมีคุณสมบัติพิเศษคือ ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราแต่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์อะไมเลสในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้น พอลูลูแลนจึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่ให้พลังงานต่ำมากและสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสม ในอาหารสำหรับคนที่ต้องการลดน้ำหนัก สำหรับการศึกษาล่าสุดยังพบว่า พอลูลูแลนที่กินเป็นอาหารนั้นสามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติก (prebiotics) คือ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้ (Leathers, 2003)

เมื่อละลายผงพอลูลูแลนให้อยู่ในรูปของสารละลาย จะได้สารละลายที่มีความหนืดและความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น พอลูลูแลนจึงสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ เช่น เครื่องดื่มชนิดต่างๆ และอาหารจำพวกไส้กรอก เป็นต้น ยังมีรายงานกล่าวถึงการใช้พอลูลูแลนเป็นสารเติมแต่งในเครื่องสำอาง โลชั่น และแชมพู นอกจากนี้ พอลูลูแลนยังมีคุณสมบัติในการเชื่อมยึด (adhesive property) ได้ดี จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์โดยใช้เป็นส่วนผสมในสารที่ใช้รักษาบาดแผล (wound healing) และใช้ในการยึดฟันปลอม (denture adhesive) ตลอดจนสามารถใช้เป็นสารเชื่อมและสารคงความเสถียรในอาหารบางชนิด เช่น ใช้ยึดส่วนผสมในขนมคุกกี เป็นต้น

แผ่นฟิล์มของพอลูลูแลนสามารถเตรียมได้โดยการนำสารละลายพอลูลูแลนความเข้มข้นประมาณ 5-10% มาทำให้แห้งจะทำให้ได้แผ่นฟิล์มใสและบาง ซึ่งสามารถทำให้แผ่นฟิล์มบางได้ถึง 5-10 ไมโครเมตร

และมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) สามารถต้านทานต่อการผ่านเข้าออกของออกซิเจนได้ดี และแผ่นฟิล์มของพอลูลูแลนที่ไม่มีการปรับสภาพจะสามารถละลายน้ำได้ดีจึงเหมาะสำหรับนำไปใช้เคลือบอาหาร (food coating) จากคุณสมบัตินี้จึงสามารถนำพอลูลูแลนไปใช้สำหรับเคลือบอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีไขมันสูง ซึ่งจะช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าอาหารที่เคลือบด้วยอะไมโลส นอกจากนี้ แผ่นฟิล์มของพอลูลูแลนสามารถเติมแต่งสีหรือกลิ่นรสสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่างๆ ได้ (Leathers, 2003) ในอุตสาหกรรมยามีการใช้ฟิล์มของพอลูลูแลนซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้อย่างรวดเร็ว นำไปเคลือบสารสำหรับใช้ในการฆ่าเชื้อโรคในปากได้ ในปัจจุบันมีการวางขายสินค้าชนิดนี้ตามท้องตลาดทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยด้วย ชื่อว่า Cool Mint Listerine Pocketpaks จำหน่ายโดยบริษัท Pfizer ปัจจุบันบริษัท ฮายาชิบารา ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ คือ แคปซูลจากพอลูลูแลนใช้สำหรับบรรจยา (Leathers, 2003)

นอกจากพอลูลูแลนแล้วยังมีการสร้างอนุพันธ์ของพอลูลูแลน (pullulan derivatives) ขึ้นมาเพื่อวัตถุประสงค์ในการที่จะลดความสามารถในการละลายและช่วยทำให้เกิดประจุหรือมีหมู่ที่เกิดปฏิกิริยาได้ ความสามารถในการละลายของพอลูลูแลนสามารถลดลงได้โดยกระบวนการเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) หรือ อีเทอร์ิฟิเคชัน (etherification) ส่วนการทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (hydrogenation) กับพอลูลูแลนจะทำให้พอลูลูแลนมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงมากขึ้น เม็ดพอลูลูแลนที่ได้จากการเชื่อมขวาง (cross-link) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography) ได้ (Leathers, 2003) ส่วนอนุพันธ์ชนิดอื่นๆ ได้มีการทดลองผลิตขึ้นและมีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่น ไซยาโนเอทิลเลทพอลูลูแลน (cyanoethylated pullulan) สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ได้ พอลูลูแลนซัลเฟต คลอริเนต และคลอโรอัลจิเนต เป็นต้น

มีการนำไปผลิตเป็นไฮโดรเจลอนุภาคนาโนของพุลลูแลน ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย

ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ พุลลูแลนนี้นี้มีความก้าวหน้ามากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การประยุกต์ใช้พุลลูแลนในด้านการแพทย์ เช่น การผลิต อนุภาคนาโนของพุลลูแลนอะซิเตต (pullulan acetate nanoparticle) เพื่อใช้เป็นตัวพาหะนำพาา (drug delivery carrier) สำหรับการใช้รักษาโรคมะเร็ง เป็นต้น (Zhang et al., 2009)

สรุป

พุลลูแลนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภท คาร์โบไฮเดรตีสตัสสายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* ปัจจุบันได้มีการนำพุลลูแลนมาใช้ประโยชน์มากมาย หลายด้าน เช่น ด้านอาหาร ด้านยา ด้านอิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมการผลิต พุลลูแลนนี้นี้มีเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น ดังนั้น จึงเป็นเรื่องน่าสนใจที่จะมีการพัฒนาการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมขึ้นภายในประเทศไทย ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศได้อีกในอนาคตได้อีกแนวทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- Badr-Eldin, S. M., Ei-Tayeb, O. M., Ei-Masry, H. G., Mohamad, F. H. A. and El-Rhman, O. A. A. (1994). Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation. *World J Microbiol Biotechnol.* 10: 423-426.
- Barnett, C., Smith, A., Scanlon, B. and Israilides, C. J. (1999). Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed starch waste. *Carbohydr Pol.* 38: 203-209.
- Bauer, R. (1938). Physiology of *Dermatium pullulans* de Bary. *Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 2* 98: 133-167.
- Bernier, B. (1958). The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. *Can J Microbiol.* 4: 195-204.
- Catley, B. J. (1971). Utilization of carbon source by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. *Appl Microbiol.* 4: 641-649
- Catley, B. J., Robyt, J. F., and Whelan, W. J. (1966). A minor structural feature of pullulan. *Biochem J.* 5P-8P.
- Corsaro, M. M., De Castro, C., Evidente, A., Lanzetta, R., Molinaro, A., Parilli M., and Sparapano, L. (1998). Phytotoxic extracellular polysaccharide fractions from *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr strains. *Carbohydr Pol.* 37: 167-172.
- Fraser, C. G., and Jennings, H. J. (1971). A glucan from *Tremella mesenterica* NRRL-Y6158. *Can J Chem.* 49: 1804-1807.
- Gibson, L. H. and Coughlin, R. W. (2002). Optimization of high molecular weight pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch fermentations. *Biotechnol Prog.* 18: 675-678.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Roukas, T. and Izydorczyk, M. (2002). Production and characterization of pullulan from beet molasses using a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Appl Biochem Biotechnol.* 97: 1-22.
- Leathers, T. D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62: 468-473.
- Leathers, T. D., Nofsinger, G. W., Kurtzman, C. P. and Bothast, R. J. (1988). Pullulan production

- by color variants of *Aureobasidium pullulans*. J Indus Microbiol. 3: 231-239.
- Oliva, E. M., Cirelli, A. F., and De Lederkremer, R.M. (1986). Characterization of a pullulan in *Cyttaria darwinii*. Carbohydr Res. 158: 262-267.
- Prasongsuk, S., Berhow M. A., Dunlap C. A., Weisleder D., Leathers T. D., Eveleigh D. E., and Punnapayak H. (2007). Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. J Indus Microbiol Biotechnol. 34: 55-61.
- Prasongsuk, S., Sullivan, R. F., Kuhirun, M., Eveleigh, D. E., and Punnapayak, H. (2005) Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. World J Microbiol Biotechnol. 21: 393-398.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. (2003). Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. J Indus Microbiol Biotechnol. 30: 89-94.
- Reed-Hamer, B. and West, T. P. (1994). Effects of complex nitrogen sources on pullulan production relative to carbon source. Microbios. 80: 83-90.
- Reis, R. A., Tischer, C. A., Gorris P. A. J., and Iacomini, M. (2002). A new pullulan and a branched (1 → 3)-, (1 → 6)-linked β-glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. FEMS Microbiol Lett. 210: 1-5.
- Schuster, R., Wimenzig, E. and Mersmann, A. (1993). Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 39: 155-158.
- Tarabasz-Szymanska, L., Galas, E. and Pankiewicz, T. (1999). Optimization of productivity of pullulan by means of multivariable linear regression analysis. Enz. Microb. Tech. 24: 276-282.
- Tsujioka, Y., and Mitsuhashi, M. (1993). Pullulan. In: Whistler, R. L., and BeMiller, J. N. (eds) Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives, 3rd edn. San Diego: Academic Press, pp. 447-460.
- Ueda, S., and Kano, H. (1965). Polysaccharide produced by the genus Pullularia II. Trans-μ-glucosidation by acetone cells of Pullularia. Appl Microbiol. 13: 882-885.
- Waksman, N., De Lederkremer, R. M., and Cerezo, A. S. (1977). The structure of an α-D-glucan from *Cyttaria harti* Fischer. Carbohydr Res. 59: 505-515.
- West, T. P. and Reed-Hamer, B. (1991). Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. Microbios. 67: 117-124.
- Yuen, S. (1974). Pullulan and its applications. Proc Biochem. 9: 7-9, 22.
- Yurlova, N. A. and De Hoog, G. S. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. Antonie van Leeuwenhoek. 72: 141-147.
- Yurlova, N. A., De Hoog, G. S. and Gerrits van den Ende, A. H. G. (1999). Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. Stud Mycol. 43: 63-69.
- Zhang, H., Gao, F., Liu, L., Li, X., Zhou, Z., Yang, X. and Zhang, Q. (2009). Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. Colloid Surface. B 71: 19-26.
- <http://www.hayashibara-intl.com/food/pullulan.html>. Retrieved July 2, 2009.



การเตรียมเยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์สังเคราะห์

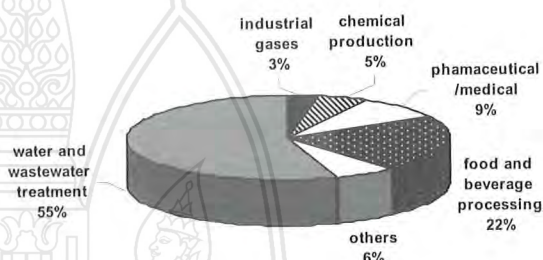
Preparation of Synthetic Polymer Membranes

วันฉัตร ชินผา¹

บทนำ

กระบวนการเยื่อแผ่นสังเคราะห์ คือ กระบวนการที่ใช้เยื่อแผ่นเพื่อแยกสาร หรือเพิ่มความเข้มข้น หรือทำให้บริสุทธิ์ขึ้น สำหรับสารละลาย หรือก๊าซผสม กระบวนการเยื่อแผ่นถูกค้นพบมานานกว่า 30 ปีแล้ว และได้มีการพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับ จนในปัจจุบันนี้มีการใช้กระบวนการเยื่อแผ่นสังเคราะห์หลายกระบวนการในอุตสาหกรรมต่างๆ (รูปที่ 1) เช่น การบำบัดน้ำเสีย การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในทางน้ำนม การผลิตน้ำดื่มจากน้ำกร่อยหรือน้ำทะเล หรือทางการแพทย์ใช้ทำเป็นไตเทียม เป็นต้น โดยอาจนำไปใช้แทนหรือใช้ร่วมกับกระบวนการแยกธรรมดา เช่น การกำจัดหรือขจัดเอาสิ่งสกปรกออกจากน้ำเสียโดยการแยกด้วยแรงเหวี่ยง การตกตะกอน เป็นต้น (รัตนา จิระรัตนานนท์, 2541) กระบวนการเยื่อแผ่นมีจุดเด่นในแง่ของการใช้พลังงานต่ำ ทำให้สามารถดำเนินการได้ที่สภาวะปกติ ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่อาจเสื่อมสภาพเมื่อได้รับความร้อน กระบวนการเยื่อแผ่นสามารถดำเนินการได้โดยไม่ต้องใช้สารเติมแต่ง (additives) อื่นๆ ร่วมในกระบวนการ และยังไม่ต้องให้เกิดสารเหลือทิ้ง ในปัจจุบันเยื่อแผ่นยังได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านของพลังงาน โดยใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์เชื้อเพลิงประเภทพอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรน

(Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell) หรือ หมายถึง เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange membrane) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสะอาด (Chen et al., 2004, Lee et al., 2008 และ Fu et al., 2008)



รูปที่ 1 ตลาดการใช้เยื่อแผ่น (จันทอง สุนทรภา, 2547)

เยื่อแผ่น หรือเมมเบรน (membrane) คือ ตัวกลางที่ทำหน้าที่กั้นระหว่างเฟส 2 เฟส โดยทั่วไปเยื่อแผ่นเป็นฟิล์มที่เป็นของแข็ง และอาจเป็นของเหลว ลักษณะที่สำคัญที่สุดของเยื่อแผ่น คือ มีคุณสมบัติในการเลือกผ่านสารหนึ่งมากกว่าสารอื่น (semi-permeable/permeable membrane) การเลือกผ่านสารเป็นผลมาจากโครงสร้างทางเคมี หรือทางกายภาพ ซึ่งอาจพิจารณาได้จากการมีสัมพรรคภาพ (affinity) ของเยื่อแผ่นต่อสาร หรือจากขนาดของรูพรุน หรือจากการมีประจุของเยื่อแผ่น (รัตนา จิระรัตนานนท์, 2541) เป็นต้น

¹ สาขาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

ตารางที่ 1 สรุปการแบ่งชนิดของเยื่อแผ่น และกระบวนการเยื่อแผ่น

กระบวนการ	กลไกการแยก/แรงขับ	ขนาดรู(Å)	โครงสร้าง
ไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration,MF)	การคัดขนาด/ความดัน	500-20,000	สมมาตร
อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration, UF)	การคัดขนาด/ความดัน	30-1,000	ไม่สมมาตร
ไดอะไลซิส (Dialysis, D)	การคัดขนาด/ความเข้มข้น	75-100	ไม่สมมาตร
	การละลาย-การแพร่/ความเข้มข้น	≥ 15	
นาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration,NF)	การคัดขนาด/ความดัน	10-50	ไม่สมมาตร
ออสโมซิสผันกลับ(Reverse Osmosis,RO)	การละลาย-การแพร่/ความดัน	< 5	ไม่สมมาตร
อิเล็กโทรไดอะไลซิส(Electrodialysis,ED)*	ประจุ/แรงเคลื่อนไฟฟ้า	-	สมมาตร

*ใช้เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออน, - ไม่มีรูพรุน (nonporous)

วัสดุที่นำมาทำเป็นเยื่อแผ่นอาจเป็นสารอินทรีย์ เช่นพอลิเมอร์ หรือสารอนินทรีย์ แต่ในบทความนี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะเยื่อแผ่นที่ทำจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ เพราะเยื่อแผ่นส่วนใหญ่เตรียมจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งมีราคาไม่แพงมาก ขึ้นรูปได้ง่าย พอลิเมอร์สังเคราะห์บางชนิดมีความแข็งแรงเชิงกล ความทนทานต่อสารเคมี และความร้อนได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นมีพอลิเมอร์หลายชนิดสามารถนำมาผลิตเป็นเยื่อแผ่นได้ ในขณะที่วัสดุอนินทรีย์ที่นำมาผลิตเป็นเยื่อแผ่นได้มีอยู่จำกัด (รัตนา จิระรัตนานนท์, 2541)

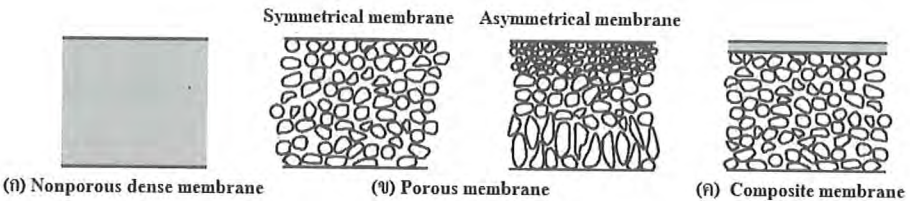
เยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์สังเคราะห์สามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้าง (รูปที่ 2) ได้ดังนี้

1. เยื่อแผ่นชนิดเนื้อแน่น หรือไม่มีรูพรุน (dense membrane or nonporous) เหมาะสำหรับการใช้ในการเตรียมเยื่อแผ่นที่ใช้ในกระบวนการแยกก๊าซ และใช้เป็นเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออน
2. เยื่อแผ่นแบบมีรูพรุน (porous membrane) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

2.1 เยื่อแผ่นที่มีรูพรุนแบบสมมาตร (sym-metric microporous membrane) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการ MF เนื่องจากให้ค่าฟลักซ์สูงมากกว่าแบบเยื่อแผ่นเนื้อแน่น และนำไปใช้ทางการแพทย์

2.2 เยื่อแผ่นแบบไม่สมมาตร (asymme-tric membrane) สำหรับกระบวนการ MF UF NF หรือ RO

3. เยื่อแผ่นเชิงประกอบ (composite mem-brane) เป็นเยื่อแผ่นที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนบนเป็นชั้นเนื้อแน่นที่ควบคุมการกักกันสาร (active layer) ส่วนชั้นล่างเป็นชั้นรองรับ (support) มีรูพรุนขนาดใหญ่ช่วยเสริมความแข็งแรงเชิงกลของเยื่อแผ่น เยื่อแผ่นประเภทนี้ถือได้ว่าเป็นเยื่อแผ่นแบบไม่สมมาตรเช่นกัน โดยทั่วไปเยื่อแผ่นประเภทนี้มักถูกนำไปใช้ในกระบวนการ NF และ RO เนื่องจากต้องใช้แรงขับเคลื่อนสูงในระหว่างกระบวนการแยก



รูปที่ 2 โครงสร้างของเยื่อแผ่น (Baker, 2004)

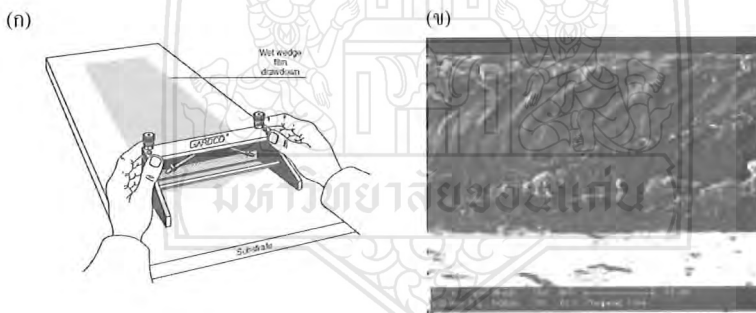
การเตรียมเยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์สังเคราะห์

การเตรียมเยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์นั้นในความเป็นจริงสามารถเตรียมได้หลายวิธี แต่ในบทความนี้จะกล่าวถึงการเตรียมเยื่อแผ่นจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ในทางการค้าเท่านั้น เนื่องจากวิธีนี้เป็นที่นิยมและสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ โดยจะแบ่งวิธีการเตรียมตามลักษณะโครงสร้างของเยื่อแผ่น โดยเยื่อแผ่นชนิดเนื้อแน่นสามารถเตรียมได้จากเทคนิคที่เรียกว่า การละลายและขึ้นรูป (Solution casting) และการเตรียมเยื่อแผ่นแบบมีรูพรุนซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การแทรก-เอซิงของฟิล์มพอลิเมอร์ (Track-etching) และการยืดฟิล์มพอลิเมอร์ (Stretching) ซึ่งใช้เตรียมเยื่อแผ่นที่มีรูพรุนแบบสมมาตร และ เฟสอินเวอร์ชัน (Phase Inversion) ที่สามารถเตรียมเยื่อแผ่นได้ทั้งแบบสมมาตรและไม่สมมาตร

1. การละลายและการขึ้นรูป (Solution casting)

เทคนิคนี้ทำได้ง่ายโดยการละลายพอลิเมอร์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วแผ่ (cast) สารละลาย

พอลิเมอร์ (casting solution) ให้มีความสม่ำเสมอบนแผ่นรอง (substrate) โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Doctor blade หรือ Casting bar หรือ Hand-casting knife ดังแสดงในรูปที่ 3 (ก) หลังจากนั้นจึงทำให้เยื่อแผ่นแห้งโดยการตั้งสารละลายให้ตัวทำละลายระเหยออกมาก็จะได้เยื่อแผ่นที่มีความหนาตามปริมาณ และความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ Baker (2004) รายงานว่าความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคนี้ คือ 15-20 ร้อยละโดยน้ำหนัก (wt%) และตัวทำละลายที่เหมาะสมต้องระเหยได้ไม่ช้าหรือเร็วเกินไป (moderately volatile solution) เช่น อะซีโตน เอทิลอะซิเตด และไซโครเฮกเซน เป็นต้น เยื่อแผ่นที่ได้จาก วิธีนี้เป็นเยื่อแผ่นชนิดเนื้อแน่น (รูปที่ 3 (ข)) ซึ่งสามารถนำไปใช้สำหรับกระบวนการแยกก๊าซ และใช้เป็นเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออน เป็นต้น เยื่อแผ่นชนิดนี้ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการที่ใช้ความดันเป็นแรงขับเคลื่อน เช่น MF UF NF และ RO เนื่องจากให้ค่าอัตราการไหลผ่าน (flux) ต่ำ



รูปที่ 3 Hand-casting knife สำหรับแผ่สารละลายพอลิเมอร์ให้เป็นแผ่น (ก) (Baker, 2004) และภาคตัดขวางของเยื่อแผ่นชนิดเนื้อแน่น (ข) (Xiuzhi and Xue, 2007)

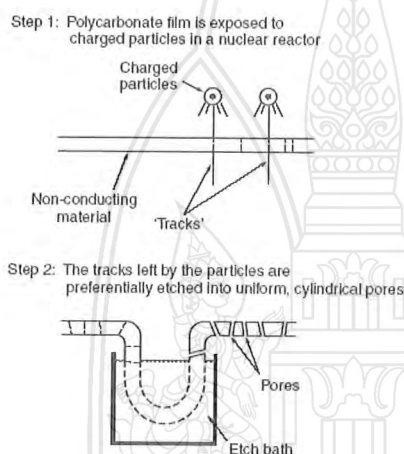
2. การแทรก-เอซิง ของฟิล์มพอลิเมอร์ (Track-etching)

การเตรียมเยื่อแผ่นโดยเทคนิค Track-etching ถูกพัฒนาโดย General Electric Corporation Schenectady Laboratory เป็นเทคนิคที่สามารถผลิตเยื่อแผ่นที่มีรูพรุนเป็นทรงกระบอก (cylindrical pores)

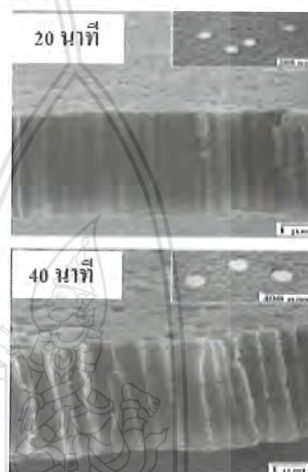
ขนาดเท่าๆ กัน เทคนิคนี้ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 4(ก) ขั้นตอนแรกเป็นการระดมยิงลำอนุภาคที่มีพลังงานสูง (accelerated heavy ion) ให้แก่ฟิล์มพอลิเมอร์ด้วยเครื่องเร่งอนุภาค ซึ่งทำให้พันธะของพอลิเมอร์ ณ ตำแหน่งที่ถูกยิงด้วยลำอนุภาคถูกทำลาย (polymer degradation) ขั้นตอนต่อมาแผ่นฟิล์ม

ที่ถูกยิงด้วยลำอนุภาคแล้วจะถูกผ่านไปยังอ่างกัดเนื้อพอลิเมอร์ (etching bath) ทำให้ตำแหน่งที่ถูกยิงด้วยลำอนุภาคถูกกัดออกกลายเป็นรูพรุนทรงกระบอก เยื่อแผ่นที่ผลิตได้ด้วยวิธีนี้จะมีขนาดรู 0.02-10 ไมโครเมตร และความหนาแน่นของรูพรุน หรือ porosity ด้วยวิธี Track-etching สามารถกำหนดความหนาแน่นของรูพรุน (density) ได้จากการควบคุมปริมาณไอออน (ion density) ของอนุภาคไอออนที่ผ่านมายังแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ (Zuzanna et al., 2003) และสามารถควบคุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนได้จากระยะเวลาที่แช่ใน etching bath (Bomko et al., 2008) ดังแสดง

(ก)



(ข)



รูปที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมเยื่อแผ่นให้มีรูพรุนโดยวิธี Track-etching (ก) (Porter, 1974) และภาคตัดขวางของเยื่อแผ่น PET หลังจากแช่ในอ่างกัด NaOH ที่เวลาต่างกัน (ข) (Bomko et al., 2008)

3. การยืดฟิล์มพอลิเมอร์ (Stretching)

พอลิเมอร์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นเยื่อแผ่นที่มีรูพรุนโดยเทคนิคนี้ต้องเป็นพอลิเมอร์ที่มีผลึก (semi-crystalline polymers) เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene, PE) พอลิโพรไพลีน (polypropylene, PP) พอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (poly(tetrafluoroethylene), PTFE) พอลิเมอร์เหล่านี้ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น จึงไม่นิยมนำมาเตรียมเป็นเยื่อแผ่นโดยใช้เทคนิคการละลายและการขึ้นรูป

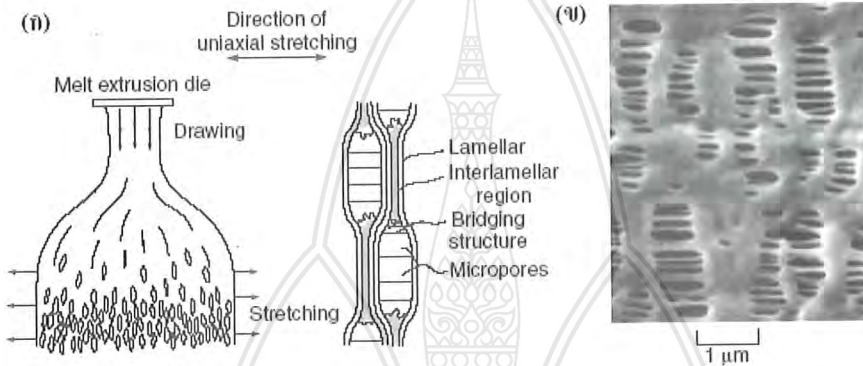
ในรูปที่ 4(ข)

เยื่อแผ่นที่เตรียมด้วยเทคนิคนี้ส่วนใหญ่แล้วเตรียมได้จากพอลิคาร์บอเนต (polycarbonate: PC) และสารละลายที่ใช้ในการกัด (etching solution) คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตัวอย่างเยื่อแผ่นพอลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นและถูกนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ เช่น PC มีชื่อทางการค้าว่า Nucleopore™ (Whatman) หรือ พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate: PET) ชื่อทางการค้าคือ RoTrac(r) (Oxyphen AG) ซึ่งนำมาใช้งานในกระบวนการไมโครฟิวดเรชัน

สำหรับกระบวนการเตรียมนั้น ในขั้นตอนแรกพอลิเมอร์ เช่น PP ถูกอัดรีด (extrude) ที่อุณหภูมิใกล้จุดหลอมเหลวของพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกัน PP ที่หลอมเหลวแล้วก็จะถูกดึงออกมาในทิศทางเดียวกับการอัดรีด ส่งผลให้เกิดเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในทิศทางเดียวกัน หลังจากนั้นฟิล์มพอลิเมอร์ถูกนำมาทำให้เย็น และเมื่อให้ความร้อนอีกครั้งที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวเล็กน้อย (annealing) ฟิล์มพอลิเมอร์จะถูกดึงยืดออก (ยืดออกถึง 300 % ของความยาวเดิม) อีกครั้งในทิศทาง

ที่ตั้งฉากกับการดึงครั้งแรก ในระหว่างการดึงยืดครั้งที่สองส่วนของโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous region) จะเกิดการเปลี่ยนรูป (deformation) กลายเป็นช่องว่าง (slit-like pore) ที่กว้างประมาณ 200-2500 Å (รูปที่ 5(ก) และ 5(ข)) (Bierenbaum, 1974) ขนาดของรูพรุนของเยื่อแผ่นที่เตรียมด้วยเทคนิคนี้สามารถควบคุมได้โดยการควบคุมอัตราการดึง (rate of

elongation) และปริมาณการยืด (extent of elongation) ของฟิล์มพอลิเมอร์ในระหว่างขั้นตอนที่สอง (Farhad et al., 2007) ตัวอย่างของเยื่อแผ่นที่ผลิตในเชิงพาณิชย์สำหรับใช้ในทางการแพทย์ โดยใช้ในเครื่องช่วยการทำงานของปอด หรือ ปอดเทียม (oxygenator) เช่น Celgard(r) (เยื่อแผ่น PP), Goretex(r) (เยื่อแผ่น PTFE)



รูปที่ 5 การเตรียมแผ่นฟิล์ม PP ที่มีรูพรุนโดยการดึงยืด (ก) และผิวหน้าของฟิล์ม PTFE ที่ได้จาก SEM (ข) (Bierenbaum et al., 1974)

4. เฟสอินเวอร์ชัน (Phase Inversion or Phase Separation)

การเตรียมเยื่อแผ่นที่ใช้งานในปัจจุบันนี้ไม่จำเป็นจะเป็นกระบวนการ MF UF NF หรือ RO ถึงแม้จะมีโครงสร้างและลักษณะที่แตกต่างกันอยู่บ้าง แต่อาจกล่าวได้ว่าส่วนใหญ่แล้วเยื่อแผ่นเหล่านี้เตรียมโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า “เฟสอินเวอร์ชัน” (Phase Separation or Phase Inversion Method) เทคนิคเฟสอินเวอร์ชันเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ ค่าใช้จ่ายต่ำ (ขันทอง สุนทรภา, 2547) และพอลิเมอร์หลายชนิดสามารถเตรียมได้โดยใช้เทคนิคนี้ นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเยื่อแผ่นที่มีโครงสร้างทั้งแบบสมมาตร และไม่สมมาตรได้อีกด้วย (van de Witte et al., 1996)

เทคนิคเฟสอินเวอร์ชันเป็นกระบวนการที่ทำให้ระบบที่อยู่ในสภาพเฟสเดียวหรือสารละลาย

พอลิเมอร์เกิดการแยกเป็นสองเฟส (เนื่องจากความไม่สมดุลทางเทอร์โมไดนามิกส์) คือ เฟสที่มีปริมาณพอลิเมอร์มาก (polymer-rich phase) และเฟสที่มีปริมาณพอลิเมอร์น้อย (polymer-poor phase) จากนั้นเฟสที่มีปริมาณพอลิเมอร์มากจะเกิดการแข็งตัวกลายเป็นส่วนเนื้อของเยื่อแผ่น และเฟสที่มีปริมาณพอลิเมอร์น้อยจะกลายเป็นช่องว่าง (pore) กระบวนการในส่วนที่เป็นเนื้อของเยื่อแผ่น เทคนิคเฟสอินเวอร์ชันสามารถแบ่งได้อีก 4 วิธี (Baker, 2004) ขึ้นอยู่กับวิธีการทำให้ระบบ (homogeneous solution) เกิดการแยกเฟส ดังนี้

1. Non-Solvent Induced Phase Separation (NIPS): หลังจากสารละลายพอลิเมอร์ (polymer solution) ถูกนำไปแผ่ให้เป็นแผ่นบนแผ่นรอง หรือแผ่นกระจกด้วยอุปกรณ์เช่นเดียวกับที่ใช้ในเทคนิคการละลายและการขึ้นรูป จะได้สารละลายพอลิเมอร์ในรูปแผ่น (cast polymer solution) สารละลาย

พอลิเมอร์ในรูปแผ่นถูกจุ่มลงในอ่างของสารที่ไม่ใช่ตัวทำละลาย (non-solvent bath or coagulation bath) โดยปกตินิยมใช้น้ำ การดูดซึมน้ำและการสูญเสียตัวทำละลาย (mass exchange) อย่างรวดเร็วทำให้เกิดการแยกเฟส หรือการแข็งตัว (precipitate) จากด้านบนไปยังด้านล่างของเยื่อแผ่น ทำให้เยื่อแผ่นมีรูพรุนขนาดใหญ่ (macrovoid) ที่มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ เรียกว่า โครงสร้างแบบนิ้ว (finger-like structure) (van de Witte et al., 1996) ซึ่งเยื่อแผ่นประเภทนี้ประกอบด้วยผิวชั้นบน (upper layer) และ macrovoid ทำให้ได้โครงสร้างเป็นแบบไม่สมมาตร ดังแสดงในรูปที่ 6 (ก)

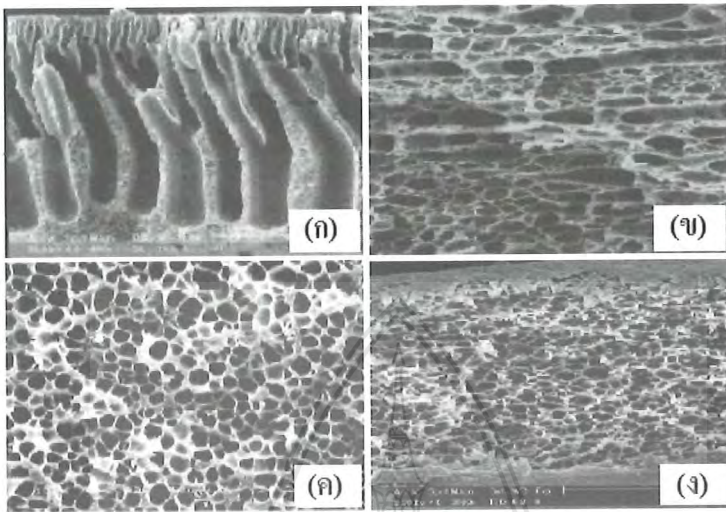
2. Vapor Induced Phase Separation (VIPS): วิธีการนี้คล้ายกับ NIPS แต่สารที่ไม่ใช่ตัวทำละลายจะอยู่ในสถานะไอ เช่น ไอน้ำ โดยที่สารละลาย พอลิเมอร์ในรูปแผ่นจะถูกวางทิ้งไว้ในบรรยากาศที่มีความชื้น (humid atmosphere) Park et al. (1999) รายงานว่าเยื่อแผ่นที่ได้จากเทคนิคนี้มีรูพรุนขนาดเล็กกว่าแบบ NIPS เนื่องจากการแลกเปลี่ยนระหว่างตัวทำละลายและไอน้ำเกิดขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าแบบ NIPS มาก ทำให้ช่องว่างที่เกิดจากส่วนของเฟสที่มีพอลิเมอร์น้อยมีการเติบโตอย่างช้าๆ ทำให้เยื่อแผ่นที่ได้มีโครงสร้างคล้ายฟองน้ำ (sponge-like structure) ดังแสดงในรูปที่ 6 (ข)

3. Thermal Induced Phase Separation (TIPS): การแยกเฟสเกิดขึ้นเนื่องจากความสามารถในการละลายของตัวทำละลายลดลงเมื่อสารละลายพอลิเมอร์ในรูปแผ่นที่ร้อนถูกทำให้มีอุณหภูมิต่ำลง สันฐานวิทยาของเยื่อแผ่นที่เตรียมได้จากเทคนิคนี้ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นแบบสมมาตรดังแสดงในรูปที่ 6 (ค)

4. Solvent Evaporation Induced Phase Separation (EIPS): สารละลายพอลิเมอร์สำหรับวิธีนี้เตรียมได้โดยการใช้ตัวทำละลายที่ได้จากของผสมระหว่างตัวทำละลาย และสารที่ไม่ใช่ตัวทำละลาย เนื่องจากตัวทำละลายระเหยง่ายกว่าสารที่ไม่ใช่ตัวทำละลาย

ดังนั้น การระเหยตัวทำละลายทำให้ความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ลดลง ส่งผลให้การแยกเฟสเกิดขึ้น สันฐานวิทยา (morphology) เช่น ความหนาของชั้นผิว ขนาด และความหนาแน่นของรูพรุนของเยื่อแผ่นที่เตรียมได้จากเทคนิคเฟสอินเวอร์ชันขึ้นกับตัวแปรหลายอย่าง เช่น ชนิดของพอลิเมอร์ ตัวทำละลาย และสารที่ไม่ใช่ตัวทำละลาย (Wang et al., 1999 ; Kim et al., 2002) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ (Di Lucio et al., 2000 ; Chinpa et al., 2006) สารเติมแต่ง (additives) (Chinpa, 2008) ตัวแปรเหล่านี้มีผลต่ออัตราเร็วในการแลกเปลี่ยนระหว่างตัวทำละลาย และสารที่ไม่ใช่ตัวทำละลายในระหว่างกระบวนการแยกเฟสในกรณีของเทคนิค NIPS และ VIPS เป็นต้น

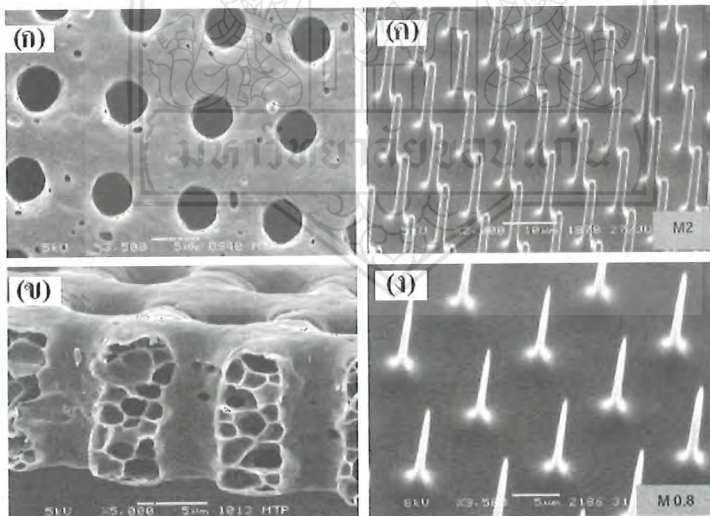
เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียมเยื่อแผ่นที่ใช้ในกระบวนการ MF ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยใช้หลักการเตรียมแบบเดียวกับ NIPS แต่สามารถเตรียมเยื่อแผ่นให้มีขนาดของรูพรุนที่เท่ากัน (uniform pore size) และรูพรุนกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ (รูปที่ 7(ก) และ 7(ข)) หรือเป็นระเบียบมากกว่าวิธีที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ เช่น วิธี Track-etching วิธีนี้สามารถเตรียมได้กับพอลิเมอร์หลายชนิด และค่าใช้จ่ายในการผลิตไม่สูงมาก เทคนิคใหม่นี้มีชื่อว่า “Phase Separation Micromolding (PSμM)” (Vogelaar et al., 2003) วิธีนี้ต่างจาก NIPS ตรงที่แผ่นรองที่ใช้จะมีลักษณะเป็นแผ่นที่ประกอบด้วยแท่งขนาดเล็กหรือเข็ม (pillar) เป็นจำนวนมากยื่นออกมาจากแผ่นรอง หรือที่เรียกว่า “Microstructured Substrate” ดังแสดงในรูปที่ 7(ค) และ 7(ง) Gironès et al. (2006) รายงานว่า ขนาดของรูพรุน (pore หรือ perforation) ของเยื่อแผ่นถูกกำหนด โดยความกว้างของ pillar และการหดตัวของพอลิเมอร์ในระหว่างเฟสอินเวอร์ชัน



รูปที่ 6 ภาพตัดขวางจาก SEM ของเยื่อแผ่นที่เตรียมด้วยเทคนิคเฟสอินเวอร์ชัน และพอลิเมอร์ต่างกัน

- (ก) PES/CAP/PVP โดยเทคนิค NIPS (Rahimpour and Madaeni, 2007)
- (ข) P(AN-MMA) โดยเทคนิค VIPS (Weihua et al., 2006)
- (ค) EAA and EAA-g-MPEG โดยเทคนิค TIPS (Jing et al., 2005)
- (ง) CA โดยเทคนิค EIPS (Sacide et al., 2005)

(PES = Polyethersulfone, CAP = Cellulose Acetate Phthalate, PVP = Polyvinylpyrrolidone, P(AN-MMA) = Poly(acrylonitrile-methyl methacrylate), EAA = Poly(ethylene-co-acrylic acid), EAA-g-MPEG = poly(ethylene-co-acrylic acid)-graft-poly(ethylene glycol monomethyl ether), CA = Cellulose acetate)



รูปที่ 7 สัณฐานวิทยาของเยื่อแผ่น PES โดยใช้เทคนิค PSuM; (ก) ผิวหน้า และ (ข) ภาพตัดขวางจาก SEM และแผ่นแบบซิกิลิกอน (Microstructure Substrate) ที่มีความกว้างของ pillar; (ค) 1.8 ไมโครเมตร และ (ง) 0.8 ไมโครเมตร (Gironès et al., 2006)

บทสรุป

โครงสร้างของเยื่อแผ่นเป็นตัวบ่งชี้ถึงลักษณะการนำไปใช้งานของเยื่อแผ่นนั้น การเตรียมเยื่อแผ่นให้มีโครงสร้างที่แตกต่างกันทำได้หลายวิธี วิธีการละลายและการขึ้นรูปสามารถเตรียมเยื่อแผ่นชนิดไม่มีรูพรุน ในขณะที่วิธีดึงยึดฟิล์ม วิธีแทรก-เอชิ่ง หรือวิธีเฟสอินเวอร์ชัน เป็นวิธีการที่ทำให้เยื่อแผ่นเกิดรูพรุน การเลือกใช้วิธีใดในการเตรียมนั้นการพิจารณาถึงคุณสมบัติของเยื่อแผ่นเพียงอย่างเดียวยังไม่เพียงพอ ปัจจัยสำคัญที่ถือได้ว่าเป็นตัวกำหนดวิธีการผลิตเยื่อแผ่น คือ วัสดุหรือชนิดของพอลิเมอร์สังเคราะห์ ดังนั้น การสังเคราะห์พอลิเมอร์เพื่อให้มีความทนทานต่อสารเคมี ความร้อน และความดันมากขึ้นถือได้ว่าเป็นทางเลือกที่สำคัญในการพัฒนาเยื่อแผ่นให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ชันทอง สุนทราภา (2547). เทคโนโลยีการแยกด้วยเมมเบรน. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 105-107.
- รัตน จิระรัตนานนท์ (2541). กระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่นสังเคราะห์. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Baker, R. W. (2004). *Membrane Technology and Application*. Second edition. Membrane Technology and Research, Inc Menlo Park, California. pp. 89-99.
- Bierenbaum, H. S., Isaacson, R.B., Druin, M. L. and Plovan, S. G. (1974). *Microporous Polymeric Films*. Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development. 13: 2-9.
- Bomko, V. A., Burban, A. F., Kobets, A. F., Kryshnal, A., Vorobyova I. V. and Zajtsev B. V. (2008). Initial stage of etching through pores in PET films irradiated by Ar ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 266: 256-261.
- Chen, S. Li., Krishnan, L., Srinivasan, S., Benziger, J., and Bocarsly, A. B. (2004). Ion exchange resin/polystyrene sulfonate composite membranes for PEM fuel cells *Journal of Membrane Science*. 243: 327-333.
- Chinpa, W. (2006). Study of the relationships between mass transfers and structure formation during elaboration process of poly(ether-imide) membrane prepared by water vapour induced phase separation. Ph.D. Thesis, Universite Montpellier II, Montpellier: 87-93.
- Chinpa, W. (2008). Preparation and characterization of an asymmetric porous poly(vinyl chloride)/poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) membrane. *ScienceAsia*. 34: 385-389.
- Di Luccio, M., Nobrega, R., and Borges, C. P. (2000). Microporous anisotropic phase inversion membranes from bisphenol-A polycarbonate: study of a ternary system. *Polymer*. 41: 4309-4315.
- Farhad, S., Abdellah, A. and Pierre, J. C. (2007). Analysis of microporous membranes obtained from polypropylene films by stretching. *Journal of Membrane Science*. 292: 62-71.
- Fu, R. Q., Julius, D., Hong, L., and Lee, J. Y. (2008). PPO-based acid-base polymer blend membranes for direct methanol fuel cells. *Journal of Membrane Science*. 322: 331-338.
- Gironès, M., Akbarsyah, I. J., Nijdam, W., van Rijn, C. J. M., Jansen, H. V., Lammertink R. G. H.

- and Wessling, M. (2006). Polymeric micro-sieves produced by phase separation micro-molding. *Journal of Membrane Science*. 283: 411-424.
- Jing, Z., Jie, Y., Rui, L., Quangguo, D. and Wei, Z. (2005). Preparation and properties of MPGE-grafted EAA membranes via thermally induced phase separation. *Journal of Membrane Science*. 267: 90-98.
- Kim I. C., Yoon H. G. and Lee K. H. (2002). Formation of integrally skinned asymmetric poly-etherimide nanofiltration membranes by phase inversion process. *Journal of Applied Polymer Science*. 84: 1300-1307.
- Lee, C. H., Park, C. H., and Lee, Y. M. (2008). Sulfonated polyimide membranes grafted with sulfoalkylated side chains for proton exchange membrane fuel cell (PEMFC) applications. *Journal of Membrane Science*. 313: 199-206.
- Park, H. C., Kim, H. Y. and Kang, Y. S. (1999). Membrane formation by water vapor induced phase separation. *Journal of Membrane Science*. 156: 169-178.
- Porter, M. C. (1974). A Novel Membrane Filter for the Laboratory. *American Laboratory (Greens Farms, Conn.)* 6: 63-76.
- Rahimpour, A. and Madaeni, S. S. (2007). Polyethersulfone (PES)/cellulose acetate phthalate (CAP) blend ultrafiltration membranes: Preparation, morphology, performance and antifouling properties. *Journal of Membrane Science*. 305: 299-31.
- Sacide, A. A., Hacer, Y. and Bulent, O. (2005). Membrane formation by dry-cast process: Model validation through morphological studies. *Journal of Membrane Science*. 249: 163-172.
- van de Witte, P., Dijkstra, P. J., van den Berg, J. W. A. and Feijen, J. (1996). Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *Journal of Membrane Science*. 117: 1-31.
- Vogelaar, L., Barsema, J. N., van Rijn, C. J. M., Nijdam, W. and Wessling, M. (2003). Phase Separation Micromolding-PS μ M. *Advanced Materials*. 15: 1385-1389.
- Wang D., Li K. and Teo K. W. (1999). Phase separation in polyetherimide/solvent/nonsolvent systems and membrane formation. *Journal of Applied Polymer Science*. 71: 1789-1796.
- Weihua, P., Xiangming, H., Li, W., Zheng, T., Changyin, J. and Churong, W. (2006). Preparation of P(AN-MMA) microporous membrane for Li-ion batteries by phase inversion. *Journal of Membrane Science*. 280: 6-9.
- Xiuzhi, T. and Xue, (2007). J. Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropene) (PVDF-HFP) membranes of ethyl acetate removal from water. *Journal of Hazardous Materials*. 153: 128-135.
- Zuzanna, S., Pavel, A., Dagmar, B., Dobri, D. D., Yuri, E. K., Reinhard, N., Reimar Spohr, Christina, T. and Kay-Obbe, V. (2003). Preparation of synthetic nanopores with transport properties analogous to biological channels. *Surface Science*. 532-535: 1061-1066.





การผลิตลิปดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้

สภาวะเฮเทโรโทรฟิก

Lipid Production from the Green Microalgae under Heterotrophic Cultivation

รัตนภรณ์ ลีสิงห์¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตลิปดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิก เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล จากการศึกษาพบว่าสภาวะเหมาะสมที่สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKU-S2 มีการสะสมลิปดสูงสุด คือ ในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน (NaNO_3) 0.5 กรัม/ลิตร ปริมาณกลูโคส 50 กรัม/ลิตร หรือที่ค่าอัตราส่วน C/N เท่ากับ 280 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน โดยเซลล์ให้ปริมาณลิปด 47.8% ของน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปด 0.374 กรัมลิปด/ลิตร/วัน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปดที่สกัดได้โดยแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า เป็นกรดไขมันชนิดสายยาวที่มีคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ซึ่งมีกรดสเตียริก กรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

Abstract

The aim of this research was to produce lipid from green microalgae under heterotrophic culture for used as the potential feedstock for biodiesel production. The optimum conditions for lipid accumulation by isolate KKU-S2 were obtained as follows: NaNO_3 as nitrogen source at 0.5 g/L and glucose as a carbon source at 50 g/L with C/N ratio at 280, at room temperature for 8 days. Under these conditions, isolate KKU-S2 accumulated lipids up to 47.8 % on a cellular dry weight and lipid production rate at 0.374 g/L/day. Gas chromatography analysis revealed that lipids from the isolate KKU-S2 contained mainly long-chain fatty acids with 16 and 18 carbon atoms. The three major constituent fatty acids were stearic acid, oleic acid and palmitic acid that are comparable to conventional vegetable oils. Based on these compositional data, microalgal lipids from the isolate KKU-S2 are a potential feedstock for biodiesel production.

คำสำคัญ : น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก ไบโอดีเซล สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

Keywords : microalgal oil, biodiesel, green microalgae

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

บทนำ

จากสถานการณ์ความไม่แน่นอนของราคา และปริมาณน้ำมันปิโตรเลียม ทำให้มีการส่งเสริมการปลูกพืชน้ำมันเพื่อผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น ส่งผลให้พืชอาหารราคาสูงขึ้นและเริ่มขาดแคลน น้ำมันจากจุลินทรีย์ (microbial oil) โดยเฉพาะจากสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) จึงได้รับความสนใจมากขึ้นและเชื่อกันว่า มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากน้ำมันสาหร่ายมีองค์ประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งมีคาร์บอนอยู่ระหว่าง 12-22 อะตอม/โมเลกุล เช่นเดียวกับน้ำมันจากเมล็ดพืช (Chelf, 1990; Ratledge, 2004) อีกทั้งมีข้อได้เปรียบในด้านการเพาะเลี้ยง คือ การเจริญไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ และฤดูกาล สังเคราะห์แสงได้ดี ให้ปริมาณเซลล์สูง และเจริญเร็วเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันอื่นๆ ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยและเพาะเลี้ยงในระดับการผลิตขนาดใหญ่ได้ (รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2550; Chisti, 2007) การใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพโดยนำน้ำมันที่สะสมในเซลล์มาผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) เช่นเดียวกับน้ำมันจากเมล็ดพืช (Sheehan et al., 1998; Scragg et al., 2003)

สาหร่ายขนาดเล็กมีการสะสมลิพิดหรือน้ำมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยบางสายพันธุ์สะสมลิพิดมากกว่า 50% โดยน้ำหนักแห้ง (Becker, 1994; Spolaore et al., 2006) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นแบบการสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ซึ่งให้ปริมาณลิพิดไม่สูงมากนัก การเพิ่มปริมาณการสะสมลิพิดในเซลล์สาหร่ายให้สูงขึ้นสามารถทำได้โดยการควบคุมเมตาบอลิซึมของเซลล์ผ่านการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) โดยมีสารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน (Miao and Wu, 2004, 2006; Xu et al., 2006) และการลดปริมาณไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทำให้เซลล์มีการสะสมลิพิดสูงขึ้น (Illman et al., 2000) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* เมื่อเจริญภายใต้สภาวะ

เฮเทโรโทรฟิกโดยมี corn powder hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เซลล์สะสมลิพิดสูงถึง 55.2% โดยน้ำหนักแห้ง และไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสาหร่ายมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืช (Xu et al., 2006) ปัจจุบันการศึกษการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้การสังเคราะห์แสงจากสาหร่ายสายพันธุ์อ้างอิงที่เก็บรักษาในหน่วยรักษาพันธุ์ (culture collection) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตลิพิดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ในพื้นดินภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิก โดยศึกษาถึงผลของปริมาณไนโตรเจนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการเจริญและการผลิตลิพิด รวมทั้งศึกษาถึงศักยภาพของลิพิดที่ผลิตได้ในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซล

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กไอโซเลท KCU-S2 ที่คัดเลือกได้จากน้ำบึงสีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น โดยสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะสังเคราะห์แสง (photoautotrophic culture) และสภาวะเฮเทโรโทรฟิก (heterotrophic culture) ในที่ไม่มีแสง (รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2551a, 2551b)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ BG-11 medium: (กรัม/ลิตร); NaNO_3 : 1.5 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 0.04 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.075 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.036, citric acid: 0.006 ferric ammonium citrate: 0.006 Na_2EDTA : 0.001 Na_2CO_3 : 0.02 Trace element solution 1 มิลลิลิตร (Trace element solution (กรัม/ลิตร): H_3BO_3 : 2.86 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.81 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.222 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.39 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.079 และ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.049) (Rippka et al., 1979)

1.3 สภาวะในการเพาะเลี้ยง คือ การหมักแบบกะ (batch fermentation) ภายใต้สภาวะเฮเทโร

โพรฟิโคในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 1000 มิลลิลิตร เชื้อคั่งต้น 10% ปริมาตร/ปริมาตร (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้องในตู้บ่มที่ไม่มีแสง และกวนผสมด้วยเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาระยะการเจริญและผลผลิต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร ตามสภาวะการเพาะเลี้ยงในข้อ 1.3 เป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกระยะเวลาที่เซลล์สะสมลูปิดสูงสุดเพื่อศึกษาในข้อ 2.2

2.2 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลผลิต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน (NaNO_3) ที่ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร ตามสภาวะการเพาะเลี้ยงในข้อ 1.3 ระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากข้อ 2.1 คัดเลือกปริมาณไนโตรเจนที่เซลล์สะสมลูปิดสูงสุดเพื่อศึกษาในข้อ 2.3

2.3 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการผลผลิต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BG-11 ตามสภาวะการเพาะเลี้ยงในข้อ 1.3 ระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากข้อ 2.1 โดยคงที่ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 2.2 และแปรผันปริมาณกลูโคสที่ 20 30 40 และ 50 กรัม/ลิตร เพื่อให้มีค่า C/N ratio อยู่ระหว่าง 100-300

3. การตรวจวิเคราะห์

3.1 วัดการเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง โดยเก็บเซลล์สาหร่ายด้วยการปั่นเหวี่ยงน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

3.2 วิเคราะห์ปริมาณลูปิด โดยเก็บเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 ทำสารแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 0.1 กรัม/มิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณลูปิดตามวิธีการของ Know and Rhee (1986); อัจฉรวรรณ ทองมี (2530) ปริมาณลูปิดคำนวณต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์

3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ (Miller, 1959)

3.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry (Lowry et al., 1951)

คำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate: μ); $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$ เมื่อ X_2 และ X_1 คือ น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัม/ลิตร) ที่เวลา t_2 และ t_1 ตามลำดับ และผลผลิตของเซลล์ (cell yield: $Y_{x/s}$); $Y_{x/s} = (X_2 - X_1) / (S_1 - S_2)$ เมื่อ S_1 และ S_2 คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) ที่เวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ

3.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน นำเซลล์สาหร่าย 1.0 กรัมมาสกัดน้ำมันโดยวิธี Soxhlet Extraction (Baker, 1984) ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ น้ำมันที่สกัดได้มาไฮโดรไลซ์กรดไขมันและเติมหมู่เมทิลโดยเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตรและไดเอทิลอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร ลงในน้ำมัน และนำไปประเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 10% BF₃ 2 มิลลิลิตร และเมทานอล 1 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 45 นาที ทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เฮกเซน 1 มิลลิลิตร เติม NaSO₄ เขย่า 1 นาที ทิ้งให้แยกชั้น และนำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) กรดไขมันแต่ละชนิดรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันต่อกรดไขมันทั้งหมด

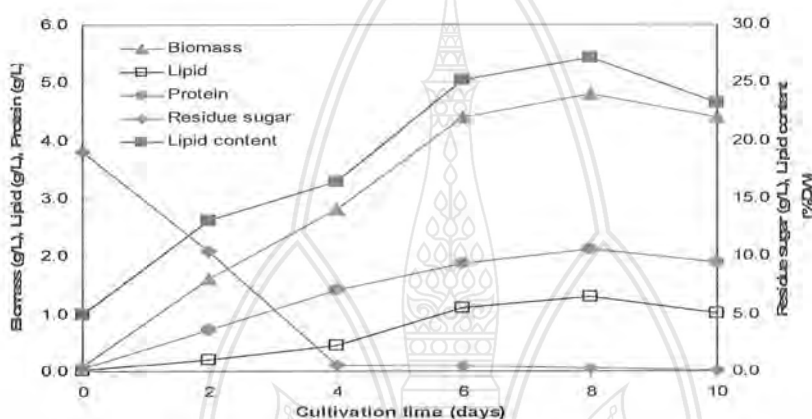
ผลการศึกษา

1. การศึกษาระยะการเจริญและผลผลิต

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKKU-S2 ในสภาวะเฮเทโรโพรฟิโคในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่

อุณหภูมิห้องในสภาวะไม่มีแสงเป็นเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายเจริญอย่างรวดเร็วตามปริมาณการลดลงของกลูโคส โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 4.8 กรัม/ลิตร เมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของการเจริญระยะ exponential phase หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โปรตีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญและเพิ่มขึ้นอย่าง

รวดเร็วในวันที่ 4 และสูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงโดยให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 1.30 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 27.1 % โดยน้ำหนักแห้ง และลดลงที่ 1.02 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 23.2 % โดยน้ำหนักแห้งในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 1) จากผลการศึกษาจึงเลือกระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน ซึ่งเซลล์มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงสุดเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 1 แสดงการเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง โปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงและการสะสมลิปิดของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

2. ผลของปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญและผลิตลิปิด

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร โดยแปรผันปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน (NaNO_3) ที่ค่าต่างๆ พบว่า เมื่อปริมาณไนโตรเจนต่ำ สาหร่ายมีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงขึ้น โดยมีปริมาณลิปิดสูงสุด 33.8% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเจริญในอาหารที่มีไนโตรเจน 0.5 กรัม/ลิตร แต่มีการเจริญต่ำที่สุดโดย

มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่ 0.195 d⁻¹ และปริมาณโปรตีน 2.72 กรัม/ลิตร ส่วนอาหารที่มีไนโตรเจน 2.0 กรัม/ลิตร สาหร่ายมีการเจริญสูงสุดโดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่ 0.216 d⁻¹ ปริมาณโปรตีน 3.94 กรัม/ลิตร แต่พบว่าเซลล์ให้ปริมาณลิปิดต่ำสุดที่ 17.5 % โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 1) จากผลการศึกษาจึงคัดเลือกปริมาณไนโตรเจนที่ 0.5 กรัม/ลิตรเพื่อศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณน้ำหนักรากแห้ง โปรตีน ปริมาณลิกนิน อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และอัตราการผลิตลิกนินของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKU-S2 เมื่อเจริญในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณไนโตรเจน (NaNO_3) ที่ค่าต่างๆ ภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน

ไนโตรเจน NaNO_3 (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักรากแห้ง (กรัม/ลิตร)	โปรตีน (กรัม/ลิตร)	ปริมาณลิกนิน (กรัม/ลิตร)	ปริมาณลิกนิน (%โดยน้ำหนักแห้ง)	μ (d^{-1})	อัตราการผลิตลิกนิน (กรัม/ลิตร/วัน)
0.5	4.76	2.72	1.61	33.8	0.195	0.201
1.0	4.78	2.81	1.38	28.9	0.196	0.173
1.5	5.00	3.10	1.35	27.1	0.201	0.169
2.0	5.61	3.94	0.98	17.5	0.216	0.123

3 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการเจริญและการผลิตลิกนิน การศึกษาผลของ C/N ratio ต่อการเจริญและการผลิตลิกนินของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKU-S2 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่คงที่ไนโตรเจนและแปรผันกลูโคสที่ 20 30 40 และ 50 กรัม/ลิตร ซึ่งมีค่า C/N ratio ที่ 112 168 224 และ 280 ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า ค่า C/N ratio มีผลต่อการเจริญและการสะสมลิกนินภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษพบว่า ในอาหารที่มีค่า C/N ratio สูง พบว่า สาหร่ายมีการเจริญและสะสมลิกนินสูงขึ้น โดยอาหารที่มีกลูโคสที่ 50 กรัม/ลิตร หรือค่า C/N ratio เท่ากับ 280 สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKU-S2 มีการสะสมลิกนินที่สูงสุดเท่ากับ 2.99 กรัม/ลิตร หรือ 47.8% โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2) อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.229 d^{-1} และอัตราการผลิตลิกนิน 0.374 กรัม/ลิตร/วัน

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณลิกนิน อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลผลิตเซลล์ ($Y_{x/s}$) และอัตราการผลิตลิกนินของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKU-S2 ในอาหาร BG-11 ที่แปรผันปริมาณกลูโคสหรือ C/N ratio ที่ค่าต่างๆ ภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน

ปริมาณกลูโคส (กรัม/ลิตร)	C/N ratio	น้ำหนักรากแห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณลิกนิน (กรัม/ลิตร/ลิตร)	ปริมาณลิกนิน (% โดยน้ำหนักแห้ง)	μ (d^{-1})	$Y_{x/s}$	อัตราการผลิตลิกนิน (กรัม/ลิตร/ลิตร/วัน)
20	112	5.2	1.60	30.8	0.206	0.331	0.200
30	168	5.7	1.97	34.6	0.218	0.225	0.246
40	224	6.0	2.38	39.7	0.224	0.175	0.298
50	280	6.3	2.99	47.8	0.229	0.150	0.374

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของ
ลิปิดหรือน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก
KKU-S2 โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า
ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 3 ชนิด คือ กรดสเตียริก
(stearic acid ; C18:0) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1)
และกรดปาล์มิติก (palmitic acid; C16:0) ในปริมาณ
39.6 29.76 และ 23.03 % ของกรดไขมันทั้งหมด

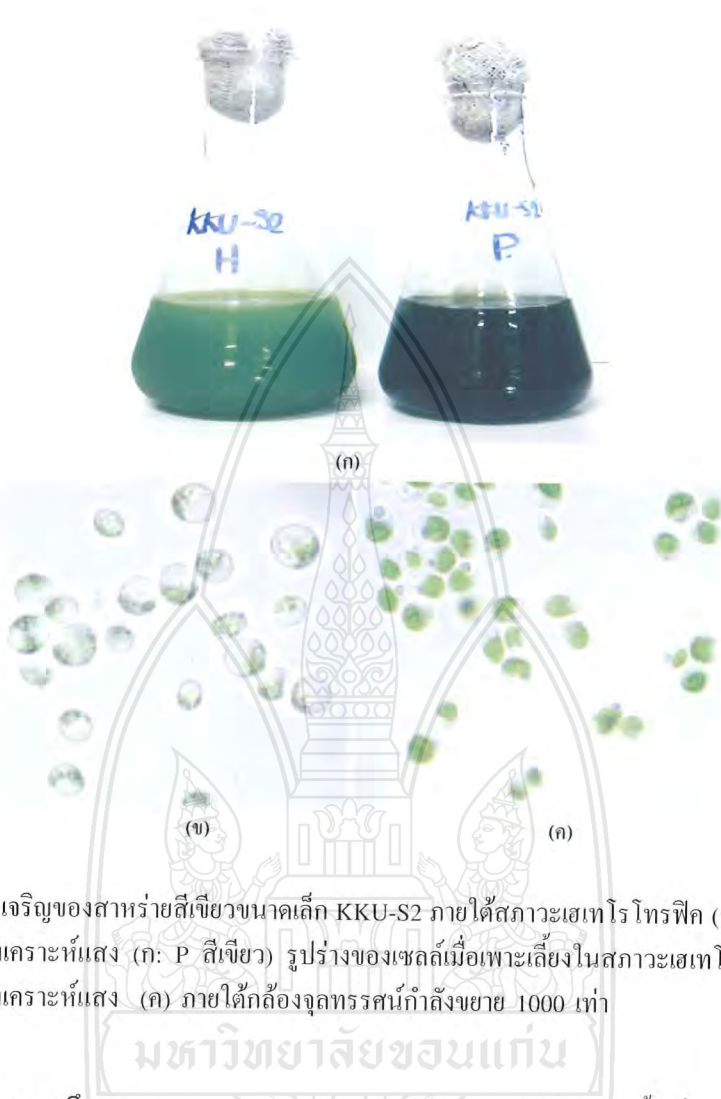
ตามลำดับ กรดไขมันชนิดอื่นที่พบ คือ กรดคาปริลิก
(caprylic acid; C8 :0) กรดไมริสติก (myristic acid;
C14:0) กรดอาราคิดิก (arachidic acid; C20 :0) กรด
ลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) และกรดลิโนเลนิก
(linolenic acid; C18:3) โดยเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและ
กรดไขมันไม่อิ่มตัว 63.9 % และ 36.1% ของปริมาณ
กรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของลิปิดที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก
KKU-S2

ประเภทของกรดไขมัน	ชนิดของกรดไขมัน	% กรดไขมัน/ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid)	caprylic acid (C8:0)	0.14
	myristic acid (C14:0)	0.41
	palmitic acid (C16:0)	23.03
	stearic acid (C18:0)	39.61
	arachidic acid (C20:0)	0.69
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid)	oleic acid (C18:1)	29.76
	linoleic acid (C18:2)	5.94
	linolenic acid (C18:3)	0.41

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว
ขนาดเล็ก KKU-S2 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน
พบว่า ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกเซลล์มีสีเหลืองของ
คาโรทีนมากกว่าคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 2 ก H) และเซลล์
มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้การ
สังเคราะห์แสง (รูปที่ 2 ก P) ส่วนรูปร่างและโครงสร้าง
ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan)

พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิก
นอกจากปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงแล้ว ยังพบการ
สะสมของลิปิดในรูปหยดน้ำมัน (oil droplets) ภายใน
เซลล์สูงขึ้น (รูปที่ 2 ข) ในขณะการเพาะเลี้ยงภายใต้
การสังเคราะห์แสง พบเม็ดคลอโรฟิลล์ขนาดใหญ่
อยู่ภายในเซลล์และพบหยดน้ำมันในปริมาณต่ำ (รูปที่
2 ค)



รูปที่ 2 แสดงการเจริญของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKKU-S2 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (ก: H สีเหลือง) และสภาวะสังเคราะห์แสง (ก: P สีเขียว) รูปร่างของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (ข) และสภาวะสังเคราะห์แสง (ค) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาการผลิตลิปิดในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KKKU-S2 ด้วยการหมักแบบกะภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การผลิตและสะสมลิปิดเกิดขึ้นในช่วงที่เซลล์เข้าสู่การเจริญในระยะ exponential phase และมีปริมาณลิปิดสูงสุดในช่วงท้ายของการเจริญระยะดังกล่าวและเริ่มลดลงเมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตลิปิดลดลงซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญของ

เซลล์ โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เซลล์มีการผลิตลิปิดสูงคือ อาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 50 กรัม/ลิตร ปริมาณไนโตรเจน 0.5 กรัม/ลิตร หรือ C/N ratio ที่ 280 บม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน โดยมีปริมาณลิปิด 47.8% โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนการเพาะเลี้ยงภายใต้การสังเคราะห์แสงให้ปริมาณลิปิด 27.3 % โดยน้ำหนักแห้ง ระยะเวลาดำเนินการ 15 วัน (รัตนภรณ์ ลิสิงห์, 2551a)

เมื่อศึกษาผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญและผลิตลิปิด พบว่า ปริมาณไนโตรเจนต่ำเหมาะต่อการผลิตลิปิดมากกว่าการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Illman et al. (2000) ที่รายงานว่า

การลดปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella emersonii* และ *C. minutissima* เซลล์มีการเจริญลดลงแต่การผลิตลิปิดสูงขึ้นถึง 63% และ 56% โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากผลการศึกษานี้จะเห็นว่า สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 สามารถเจริญได้ทุกค่าของ C/N ratio โดย C/N ratio สูงจะเหมาะสำหรับการผลิตลิปิดมากกว่าการเจริญหรือการเพิ่มปริมาณเซลล์และโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Miao and Wu (2004) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกโดยการเพิ่มปริมาณกลูโคสและลดอินทรีย์ไนโตรเจนหรือในอาหารที่มีค่า C/N ratio สูง ทำให้เซลล์มีการสะสมลิปิดสูงขึ้นและสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะสังเคราะห์แสงถึง 4 เท่า การลดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน หรือการเจริญของจุลินทรีย์โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำหรือที่ค่า C/N ratio สูงนั้น เซลล์จะลดการใช้ NADPH ในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญ และเมื่อเซลล์มีการสะสม NADPH มากขึ้นจะทำให้จะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิปิดสูงขึ้น ซึ่งการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมจำนวน 1 โมล ต้องการ NADPH จำนวน 16 โมล (Johnson and Schroeder, 1996; Ratledge, 2004)

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดหรือน้ำมันที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 พบว่า ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก คือ กรดสเตียริก กรดโอเลอิกและกรดปาล์มดิก ซึ่งมีความคล้ายกับองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืช (Ratledge, 2004) แต่ปัญหาที่อาจพบในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย คือ สาหร่ายบางชนิดผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างอียวุด (polyunsaturated fatty acids) ซึ่งมีพันธะคู่ 4 พันธะหรือมากกว่า เช่น eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) และ docosahexaenoic acid (DHA, C22:6) กรดไขมันและเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลของกรดไขมันดังกล่าวอาจเกิดการออกซิเดชันในระหว่างเก็บรักษาและเป็นสาเหตุหนึ่ง

ที่จะลดการยอมรับไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก (Belarbi et al., 2000; Chisti, 2007) แต่จะเห็นว่าน้ำมันที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว 63.9 % และ 36.1% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบส่วนใหญ่มีพันธะคู่ 1 พันธะ คือ กรดโอเลอิก (C18:1) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้น้ำมันที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล นอกจากนั้น เซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกยังพบคลอโรฟิลล์ในปริมาณต่ำซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในการสกัดน้ำมันโดยสามารถลดขั้นตอนการกำจัดคลอโรฟิลล์ลงได้ อย่างไรก็ดี ควรศึกษาถึงสภาวะต่างๆ และกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เช่น การเพาะเลี้ยงแบบกะป้อน (fed-batch cultivation) ที่มีรายงานว่าเป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณเซลล์และลิปิดสูงขึ้น (Wen et al., 2002; Shi et al., 2002; Xu et al., 2006) รวมทั้งศึกษาถึงชนิดของแหล่งอินทรีย์คาร์บอนราคาถูกทดแทนกลูโคสเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น แป้งมันสำปะหลัง กากน้ำตาล เป็นต้น และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้โดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อศึกษาศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก KCU-S2 ในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล

กิตติกรรมประกาศ

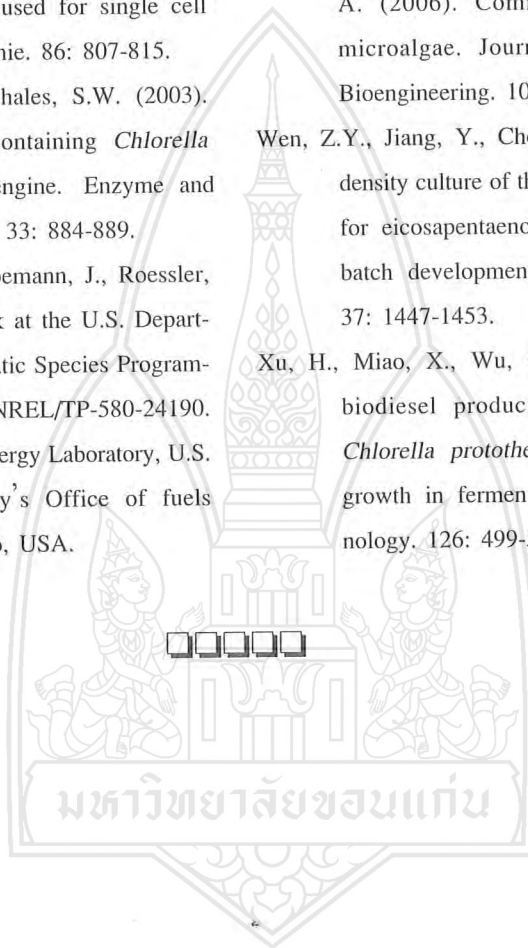
ขอขอบคุณคุณศศิประภา สามหาไทย ที่ช่วยวิจัยในขณะที่ศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รองศาสตราจารย์ งามนิจ นนทโส ผู้ริเริ่มโจทย์วิจัยและให้คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง กองทุนพัฒนาและส่งเสริมด้านวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ ปีงบประมาณ 2550 ทุนอุดหนุนวิจัยทั่วไป ปีงบประมาณ 2551 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนช่วยเหลือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มูลนิธิโทรเพื่อการพัฒนาวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ครั้งที่ 14 พ.ศ. 2550 ที่สนับสนุนทุนวิจัย

บริษัท ห้างปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จ.ขอนแก่น ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

เอกสารอ้างอิง

- รัตนภรณ์ ลิลสิงห์. (2550). ไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก (Biodiesel from microalgal oil). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. เล่มที่ 3 ปีที่ 35: 135-143.
- รัตนภรณ์ ลิลสิงห์. (2551a). การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากน้ำจืดในจังหวัดขอนแก่นเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทน. รายงานการวิจัย โครงการพัฒนานักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2549
- รัตนภรณ์ ลิลสิงห์. (2551b). การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กผลิตสูงที่เจริญแบบเฮเทอโรโทรฟิก. รายงานการวิจัยโครงการพัฒนานักวิจัยใหม่ กองทุนพัฒนาและส่งเสริมด้านวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณเงินรายได้ 2550.
- อัจฉราวรรณ ทอมี. (2530). การสกัดลิพิดจากยีสต์ไรโดโทรลดา กราซลิส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Baker, D. (1984). Fat in flour, acid analysis method. In: Official method of analysis of the AOAC (William S. ed., 14th ed.) Virginia: The William Byrd Press. Inc. pp. 251-252.
- Belarbi, E. H., Molina Grima, E., Chiti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentanoic acid esters from microalgae and fish oil. Enzyme and Microbial Technology. 26: 516-259.
- Becker, E. W. (1994). Chemical composition. Application of algae. In Becker, E. W. (ed) Microalgae: Biotechnology and Microbiology. London: Cambridge University Press. pp. 177-195.
- Chelf, P. (1990). Environment control of lipid and biomass production in two diatom species. Journal of Applied Phycology. 2:121-129.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25: 294-306.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology. 27: 631-635.
- Johnson, E. A., Schroeder, W. A. (1996). Microbial carotenoids. In: Fiechter, A., editor. Advances in Biochemistry Engineering Biotechnology. New York: Springer. pp. 119-178.
- Kwon D. Y., Rhee, J. S. (1986) A Simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. Journal of the American Oil Chemist's Society. 63: 89-92.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
- Miao, X. L., Wu, Q. Y. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. Journal of Biotechnology. 110: 85-93.
- Miao, X., Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology. 97: 841-846.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426-428.

- Rippka, R.J., Deruelles, J.B., Waterbury, M., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1978). Genetic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 111: 1-61.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 86: 807-815.
- Scragg, A.H., Morrison, J., Shales, S.W. (2003). The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 884-889.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Bebbemann, J., Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy's Office of fuels development. Colorado, USA.
- Shi, X.M., Jiang, Y., Chen, F. (2002). High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnology Progress*. 18: 723-727.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101: 87-96.
- Wen, Z.Y., Jiang, Y., Chen, F. (2002). High cell density culture of the diatom *Nitzschin laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process Biochemistry*. 37: 1447-1453.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126: 499-507.





การแยกบริสุทธิ์โอวัลบูมินและไลโซไซม์ จากไข่ขาวของไข่ไก่ โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟี

Purification of Ovalbumin and Lysozyme from Hen Egg White by Ethanol Precipitation and Chromatography.

ธิปดินทร์ ดีอันทอง¹ พัฒนา เทศทับ¹ ศิริรัตน์ หลักคำ¹
ศักดิ์ดา คาควง¹ และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์^{1*}

บทคัดย่อ

ไข่ขาวของไข่ไก่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีความสำคัญทั้งทางด้านโภชนาการ ชีวภาพ และอุตสาหกรรม โปรตีนที่มีความสำคัญและเป็นองค์ประกอบหลักสองชนิดคือโอวัลบูมิน (ovalbumin) และไลโซไซม์ (lysozyme) วิธีการแยกบริสุทธิ์โปรตีนในไข่ขาวของไข่ไก่นั้นนับว่ามีความสำคัญอย่างมากซึ่งเกี่ยวข้องกับต้นทุนทางการผลิต เวลาและผลผลิตที่ได้ การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการแยกบริสุทธิ์โปรตีนโอวัลบูมินและไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล ร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟี พบว่า วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล 40% ปริมาตร/ปริมาตร (v/v) สามารถแยกบริสุทธิ์โอวัลบูมินและไลโซไซม์ออกจากกันได้โดยมีความบริสุทธิ์ประมาณ 41.5% และ 61.8 % ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยที่ 40% (v/v) จะให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ไลโซไซม์สูงถึง 1,125.30 ยูนิต/มิลลิกรัม (U/mg) เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยมีค่า specific activity เพิ่มขึ้นถึง 4,030.00 U/mg โดยที่ทั้งสองวิธีของการแยกบริสุทธิ์ไม่ทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนที่แยกได้นั้นสูญเสีย

Abstract

Egg white is a natural source of proteins with potential nutritional, biological and industrial interest. Two major proteins, i.e. lysozyme and ovalbumin, are particularly significant. The purification method of protein from hen egg white is particularly important in value-adding of egg. In this study we have purified two major proteins from hen egg white using principal of ethanol precipitation and cation-exchange column

¹ กลุ่มวิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* Corresponding Author, Email: somkly@kku.ac.th

chromatography. This two purify methods showed high resolution to separate lysozyme and ovalbumin and the purified muteim were remained their structural and functions. The percent purity of lysozyme and ovalbumin from ethanol precipitation 40% (v/v) was 61.8% and 41.5% respectively with the specific activity of lysozyme was 1,125.30 U/mg. Moreover, for further purification step by cation exchange chromatography the specific activity of lysozyme was increased to 4,030.00 U/mg. Therefore, these methods may use as a model for industry scale purification.

คำสำคัญ: การแยกบริสุทธิ์ โอวัลบูมิน ไลโซไซม์ การตกตะกอนด้วยเอทานอล ไข่ขาว

Keywords: Purification, ovalbumin, lysozyme, ethanol precipitation, egg white

บทนำ

การเพาะเลี้ยงไข่ไก่จัดว่าเป็นอุตสาหกรรม การเกษตรที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย นอกจากเป็นอุตสาหกรรมที่ผลิตไข่ไก่เพื่อเป็นแหล่ง อาหารโปรตีนของคนทั้งประเทศแล้ว ยังมีการส่งออก ในรูปผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ไข่แช่แข็ง ไข่แห้ง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมการผลิตยังมีปัญหา เกิดขึ้น โดยเฉพาะการแตกหรือบวมร้าวของไข่ไก่มักเกิด ขึ้นเสมอในขบวนการผลิตและการวางไข่ เนื่องจาก ในประเทศไทยนิยมเลี้ยงไข่ไก่แบบขังกรงเดี่ยว ความเสียหายที่เกิดจากการแตกหรือบวมร้าวของไข่ไก่คิดเป็น ประมาณ 10% ของไข่ไก่ทั้งหมดที่ผลิตได้ในฟาร์ม ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตไข่ไก่ได้ประมาณ 9,000 ล้านฟองต่อปี เพราะฉะนั้นไข่ที่แตกหรือบวมร้าว จึงคิดเป็นปริมาณราว 900 ล้านฟองต่อปี จำนวนไข่ที่ เสียหายนี้จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการจัดจำหน่าย นอกจากนี้ ยังเป็นการเพิ่มต้นทุนเพื่อทำความสะอาดไข่ ก่อนส่งออกสู่ท้องตลาด รวมทั้งปัญหาเรื่องไข่แตกหรือ บวมร้าวและภาวะที่ต้องทำความสะอาดเล้าไก่หรือรังไข่ ปริมาณการผลิตไข่ไก่ที่มากเกินไปความต้องการของ ผู้บริโภค ทำให้ไข่ไก่ราคาตก สร้างความเสียหายแก่ ผู้เลี้ยง

ไข่ขาวของไข่ไก่ประกอบไปด้วยน้ำ 88.5% โปรตีน 9.7-10.6% คาร์โบไฮเดรต 0.5-0.6% และ ไขมัน 0.01% โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักใน ไข่ขาวของไข่ไก่เรียงจากมากไปน้อยนั้นประกอบไป

ด้วย Ovalbumin Ovotransferrin Ovomuroid Lysozyme Ovomucin Ovoglobulin Ovoflavoprotein Ovostatin, Cystatin และ Avidin ตามลำดับ โดย โอวัลบูมิน (ovalbumin) และ ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็นโปรตีน ที่มีความสำคัญมีอยู่ประมาณ 54% และ 3.4-3.5% ตามลำดับ โอวัลบูมินนั้นเป็น monomeric phospho-glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44.5 kDa และค่า pI ประมาณ 4.5 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ทั้งหมด 385 ตัว มีกรดอะมิโนซิสเทอีน 4 ตัวและมีพันธะ disulfide bridge 1 พันธะ เป็นโปรตีนที่มีบทบาทต่อ คุณสมบัติของไข่ขาว โดยในทางชีวเคมีจะนำมาใช้ในการเป็นสารตัวพา (carrier) สารที่ช่วยให้เกิดความคงทน (stabilizer) ใช้เป็น blocking agent ใช้เป็นโปรตีน มาตรฐาน และนอกจากนั้นโอวัลบูมินยังสามารถใช้ ในการบำบัดผู้ป่วยโรค cirrhosis และ hemodialysis ส่วน ไลโซไซม์นั้นจัดเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติใน การทำลายเซลล์แบคทีเรีย พบได้ทั่วไปในสารคัดหลั่ง ของทั้งคนและสัตว์ เช่น น้ำตา เป็นต้น นอกจากนั้น ยังสามารถพบได้ในพืชและแบคทีเรียบางชนิด ในไข่ไก่ เป็นอีกแหล่งหนึ่งมีไลโซไซม์อยู่เป็นจำนวนมาก โดย ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ประกอบไปด้วยกรด อะมิโน 129 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.4 kDa โดย Lysozyme จะย่อยสลายพันธะ 1-4 glycosidic linkage ระหว่าง N-acetylmuramic acid และ N-acetylglucosamine ใน polysaccharide ที่เป็นองค์ ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยสามารถคง

สภาพได้คืนในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด นอกจากนี้ยังสามารถรักษาโครงสร้างและหน้าที่การทำงานที่ 100 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 1-2 นาที โลโซไซม์ได้นำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารทดแทนการใช้สารเคมี เพื่อควบคุมแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ (Gill, 2003) เช่น ใช้เคลือบผิวผลไม้ (Cagri, 2004) ใช้ในการยับยั้ง lactic acid bacteria ในอุตสาหกรรมการปรุงเบียร์ และการผลิตไวน์ รวมทั้งงานทางเภสัชกรรม การแพทย์ และทางสัตวแพทย์ ได้มีการนำโลโซไซม์ไปใช้ประโยชน์ โดยใช้เป็นสารป้องกันร่างกายจากแบคทีเรียก่อโรค

ดังนั้น เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและการสูญเสียที่เกิดจากการแตกตัวของไข่ไก่ ลดการส่งไข่ออกสู่ตลาดในภาวะไข่ล้นตลาด และเป็นการเพิ่มมูลค่าของไข่ไก่ งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ศึกษาวิธีการแยกบริสุทธิ์โปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีบทบาทในภาคอุตสาหกรรมหลายๆ ด้าน และเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากในไข่ขาว เช่น โปรตีนโอวัลบูมินและโลโซไซม์ โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟีเพื่อประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคตต่อไป

1. วิธีการดำเนินงานวิจัย

1.1 การเตรียมและเก็บรักษาไข่ไก่ก่อนนำมาทำการทดลอง

นำไข่ไก่สดมาล้างให้สะอาดและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เตรียมไข่ขาวโดยทำการแยกไข่แดงและไข่ขาวออกจากกัน ปริมาตรรวมของไข่ขาวเป็น 4.8 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

1.2 การแยกบริสุทธิ์โลโซไซม์และโอวัลบูมินด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอล

นำส่วนของไข่ขาวที่เตรียมไว้มาเจือจาง 3 เท่า ด้วย 0.05 M NaCl ปั่นให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง แยกตะกอนไข่ขาวส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกจากนั้นนำส่วนที่ละลายมาตกตะกอนโปรตีนอื่นๆ และบางส่วนของ

โอวัลบูมินออกด้วย 1 N acetic acid ที่ pH 4.62 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แยกส่วนของตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของสารละลายมาตกตะกอนต่อด้วยเอทานอลให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นเอทานอล 40% โดยปริมาตร ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนอื่นเพื่อให้มีปริมาณโปรตีนของโลโซไซม์มากที่สุด (Sirirat, 2009) โดยมีปริมาตรรวมเป็น 33.13 ลิตร ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4°C นาน 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 8,000 รอบ/นาที (rpm) อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนสารละลายและตะกอนออกจากกัน ส่วนของตะกอนเป็นโอวัลบูมิน ส่วนของสารละลายที่เป็นโลโซไซม์ จากนั้นนำส่วนของตะกอนมาทำ lyophilize ส่วนของสารละลายนำมาทดสอบ activity วัดปริมาณโปรตีนและตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE และวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากนั้นเพิ่มความบริสุทธิ์ของโลโซไซม์โดยใช้ Column Chromatography

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976)

เปิด Bradford dye 1 มิลลิลิตร (ml) ใส่ใน microtube เติมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร (μl) ลงไป (ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ Bradford dye เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) และคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ผสมสารละลายโปรตีนตัวอย่างกับ 2x solubilizing buffer ให้ปริมาณโปรตีนสุดท้ายเป็น 1.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที โหลด protein marker และสารละลายโปรตีนตัวอย่างชนิดละ 3 $\mu\text{g}/\text{well}$ จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วย 15 % separating gel และ 4% stacking gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ จนกระทั่งทำการแยกสมบูรณ์ ย้อมโปรตีนโดยใช้ 0.1%

Coomassie Brilliant blue R-250 เป็นเวลา 30 นาที และล้างสีออกโดยใช้ destaining solution จนปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน

1.5 การแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยวิธี

Column Chromatography

การแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จะใช้คอลัมน์

Cation Exchanger Chromatography Toyopearl 650 M Carboxymethyl (CM) โดยทำการ load sample (สารละลายส่วนของไลโซไซม์ใน Ethanol 40%) ปริมาตร 1000 ml มีความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 31.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) ลงในคอลัมน์ขนาด 2.0 x 80 เซนติเมตร (cm) ที่ผ่านการทำให้เกิดสมดุล (equilibrate) ด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 กำหนดอัตราการไหล (flow rate) เป็น 15 มิลลิลิตร/ชั่วโมง (ml/hr) (Guerin-Dubiard, 2005) ทำการเก็บตัวอย่าง ละ (fraction) 7 ml เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์แล้วทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.1 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 2 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการชะ (elute) คอลัมน์แบบ linear gradient โดยใช้สารละลาย 0.1 - 0.4 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 นำทุก fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} และวัดค่ากิจกรรม (activity) ของไลโซไซม์ เก็บ fraction ที่มี activity มารวมกัน (pooled fraction) เก็บที่ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นต่อไป

1.6 การทดสอบค่า activity ของไลโซไซม์

การตรวจสอบค่ากิจกรรม (activity) ของไลโซไซม์โดยใช้วิธี spectrophotometer คือ เตรียมสารตั้งต้น (substrate solution) ในสารละลาย 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.0 โดยการเติมเชื้อ *Micrococcus luteus* (lyophilized) ผสมให้เข้ากันในเครื่องกวนสารละลายจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{540} ประมาณ 0.8-1 จากนั้นกวนทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการวัดค่า activity โดยใช้ น้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์เป็น blank เติม 3 ml ของ substrate solution ลงใน

cuvette จากนั้นเติมไลโซไซม์ 100 μ l เขย่าให้เข้ากัน แล้ววัดค่า OD_{540} ที่ลดลงทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 3 นาที โดย 1 unit (U) ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ลดลง 0.1 หน่วยภายในเวลา 1 นาที ที่ 25°C

1.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์และโอวัลบูมินด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์ และโอวัลบูมินที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนออกโดยเอทานอล (ข้อ 1.2) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40% โดยปริมาตร นำโอวัลบูมินที่ทำให้แห้ง lyophilize แล้วมาละลายกลับด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกรองสารละลายไลโซไซม์และโอวัลบูมินผ่านแผ่นกรอง (filter membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (μ m) ด้วยตัวกรอง (suction filter) และเก็บเอาส่วนที่กรองได้ไว้ที่ 4°C โหลดลงในคอลัมน์ Jupiter C4 RP-HPLC column ทำการชะด้วย buffer 2 ชนิดคือ buffer A: 0.025% TFA (v/v), buffer B: 80% acetonitrile (v/v) โดยทำการชะคอลัมน์แบบ linear gradient จาก 0 ถึง 100% ของ buffer B (Yakup, 2004) time program คือ 0 - 30 นาที เป็น 80% ของ buffer B และ 30 - 40 นาที เป็น 100% ของ buffer B flow rate 1.2 มิลลิลิตร/นาที (ml/min)

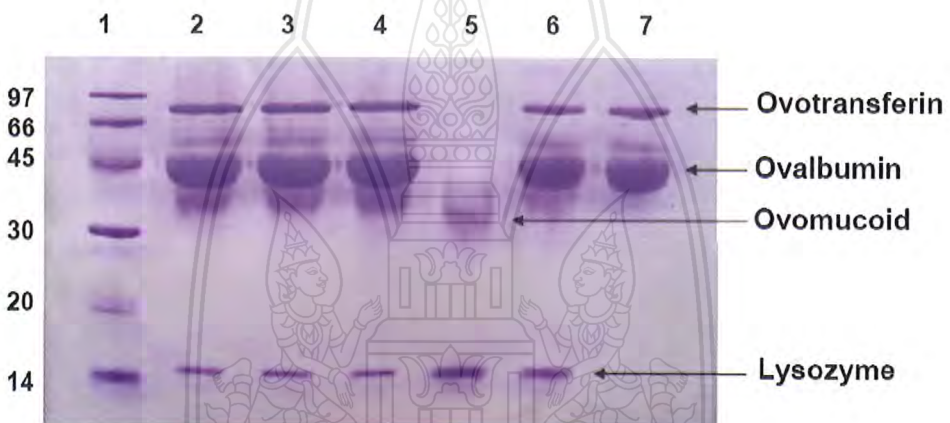
2. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

2.1 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์และโอวัลบูมินด้วย SDS-PAGE

ไลโซไซม์และโอวัลบูมินที่ได้จากแต่ละขั้นตอน ของการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี ethanol precipitation method จะนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 พบว่า รูปแบบแถบโปรตีนของไข่ขาว (Egg white, Lane 2), ไข่ขาวที่เจือจางด้วย NaCl (Egg white + NaCl, Lane 3), และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยการปรับ pH เป็น 4.62 (pH 4.62, Lane 4) มีลักษณะแถบโปรตีน

ที่คล้ายกัน คือ ประกอบด้วย โอโวทรานสเฟอริน โอวัลบูมิน โอวัลมิวคอยด์ และไลโซไซม์ ส่วนในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 40% โดยปริมาตร (40% Ethanol, Lane 5) สารละลายส่วนใหญ่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนของโอโวทรานสเฟอรินและโอวัลบูมิน พบเพียงแถบของโอวัลมิวคอยด์เพียงเล็กน้อย และแถบของไลโซไซม์ชัดเจนขึ้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดอื่นได้ถูกตกตะกอนทิ้งไปในขั้นตอนนี้เป็นส่วนใหญ่ ทำให้ได้ไลโซไซม์ที่บริสุทธิ์มากขึ้นในส่วนตะกอนของโอวัลบูมินที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยการปรับ pH เป็น 4.62 (Albumin pH 4.62, Lane 6) นั้น พบว่า ยังมีแถบโปรตีนของทั้ง

โอโวทรานสเฟอริน โอวัลบูมิน โอวัลมิวคอยด์ และไลโซไซม์ แสดงว่าในขั้นตอนนี้มีไลโซไซม์บางส่วนตกตะกอนลงมาพร้อมกับโอวัลบูมิน ส่วนตะกอนของโอวัลบูมินที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 40% โดยปริมาตร (Albumin ethanol 40%, Lane 7) พบว่า มีเพียงแถบของโอโวทรานสเฟอริน และโอวัลบูมิน แสดงว่าการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 40% โดยปริมาตรนั้นสามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์, โอวัลบูมิน และโอโวทรานสเฟอริน ออกจากกันได้ดีในระดับหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 15% gel ของไลโซไซม์และโอวัลบูมิน ในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์โดยใน Lane ที่ 1 ถึง 7 คือ Protein marker, ไข่ขาว, ไข่ขาวเจือจางด้วย NaCl, ส่วนใสของการตกตะกอนด้วย acetic acid ที่ pH 4.62 , ส่วนใสของการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40%, ตะกอนโอวัลบูมินจากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยการปรับ pH เป็น 4.62 และ ตะกอนโอวัลบูมินจากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ตามลำดับ

2.2 ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์และโอวัลบูมินโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟี

ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์และโอวัลบูมินด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเอทานอล (ethanol precipitation) พบว่า ในแต่ละขั้นตอนของการตกตะกอน คือ การเจือจางไข่ขาวด้วย NaCl การตกตะกอนด้วยการปรับ pH

เป็น 4.62 การตกตะกอนโดยใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40% โดยปริมาตรและวิธีโครมาโตกราฟี พบว่า ไลโซไซม์มีค่า specific activity เพิ่มขึ้นจาก 38.50 เป็น 72.40 1125.30 และ 4,030.00 U/mg และค่า purification fold เพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 1.88 29.22 และ 104.66 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยการตกตะกอนโปรตีนจากไข่ขาวด้วย NaCl, acetic acid pH 4.62, ethanol 40% (v/v) และ cation exchange chromatography ตามลำดับ

Sample /condition	Total protein (mg)	Total activity (U/ml)	% Recovery (%)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
NaCl	710,681.40	27,361,730.00	100	38.50	1
pH 4.62	361,772.21	26,190,846.00	95.71	72.40	1.88
Ethanol 40%	16,566.00	18,641,720.00	68.13	1125.30	29.22
Cation exchange	2,683.00	10,812,490.00	39.51	4,030.00	104.66

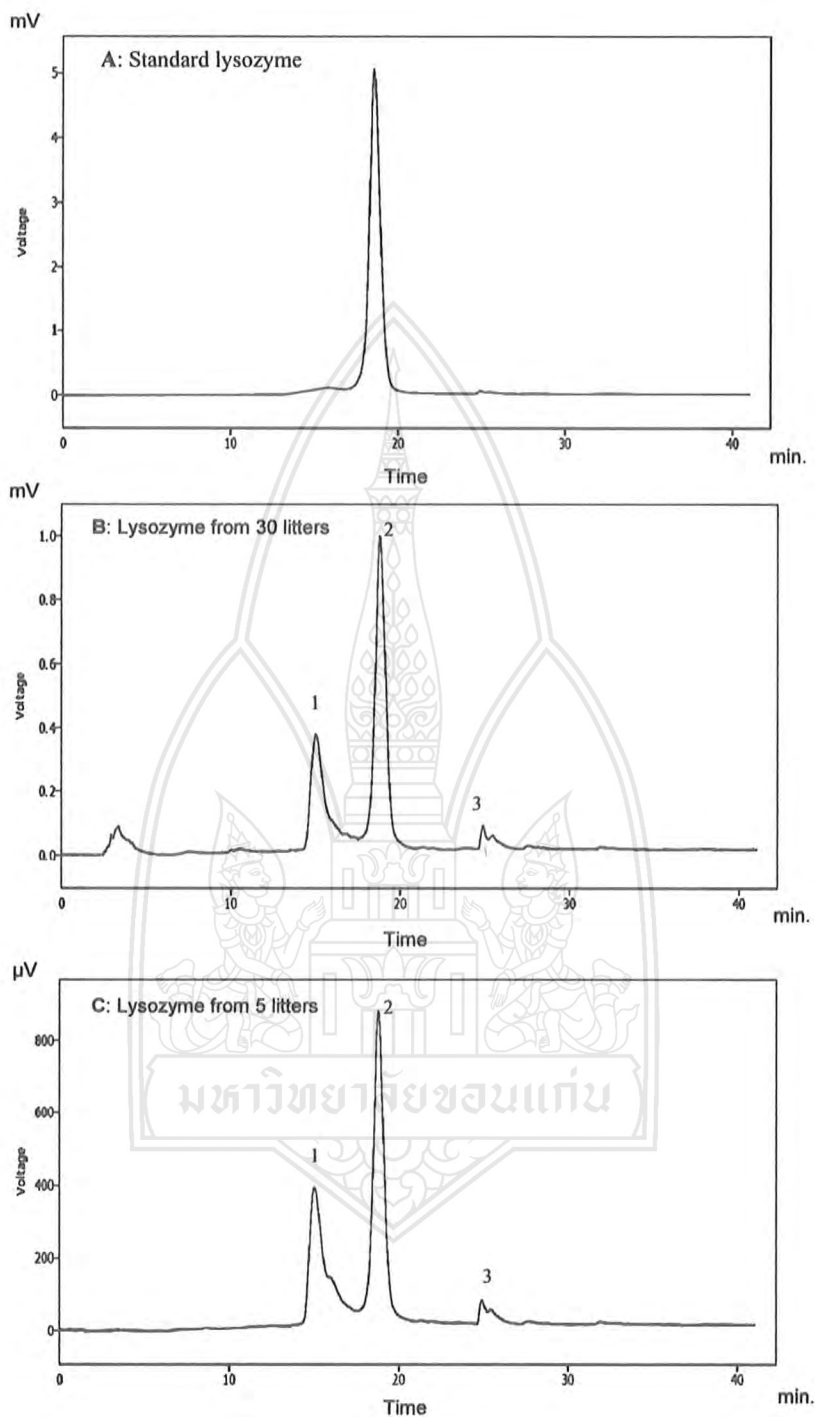
2.3การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์และโอวัลบูมินด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เมื่อนำไลโซไซม์ที่ได้จากส่วนใสของการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ที่ปริมาตรรวม 30 ลิตร และไลโซไซม์ที่ได้จากส่วนใสของการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ที่ปริมาตรรวม 5 ลิตร มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกัน จากโครมาโตแกรมที่ได้ พบว่า ประกอบไปด้วยพีค (peak)

ทั้งหมด 3 peak ที่ retention time ประมาณ 15, 18 และ 24 นาที ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (standard lysozyme) คาดว่า peak ที่ 2 ที่ retention time ประมาณ 18 นาที น่าจะเป็นไลโซไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล โดยในการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ที่ปริมาตรรวม 30 และ 5 ลิตร ได้ความบริสุทธิ์ประมาณ 61.8 % และ 57.6% ตามลำดับ พิจารณาจากพื้นที่ใต้พีค (peak area) (chromatogram c) ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของไลโซไซม์ที่ได้จากวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล 40%

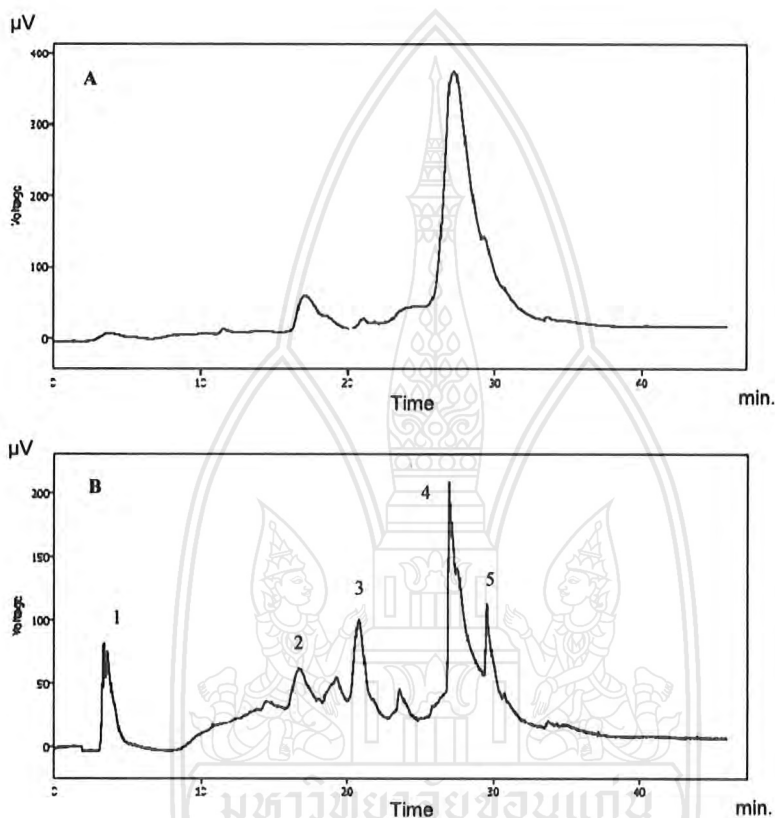
Peak number	Ethanol 40% precipitation from 30 liters			Ethanol 40% precipitation from 5 liters		
	Retention time (min)	Area (mV.s)	Area (%)	Retention time (min)	Area (mV.s)	Area (%)
1	15.010	24.696	33.7	15.025	27.167	37.7
2	18.780	45.199	61.8	18.792	41.483	57.6
3	24.880	3.314	4.5	24.892	3.371	4.7



รูปที่ 2 แสดงผลโครมาโตแกรมของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของไลโซไซม์ที่ได้จากวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล (ethanol precipitation) โดยที่ A: standard lysozyme, B: lysozyme จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ปริมาตร 30 ลิตร, C: lysozyme จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ปริมาตร 5 ลิตร

เมื่อนำโอวัลบูมิน (ส่วนตะกอนที่ได้จากวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% ที่ปริมาตรรวม 30 ลิตร) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จากโครมาโตแกรมพบว่า ประกอบด้วย 5 peak หลัก ที่ Retention time ประมาณ 3 16 20 26 และ 30 นาที ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ standard

commercial albumin คาดว่า peak ที่ 4 ที่ retention time ประมาณ 26 นาที น่าจะเป็น peak ของ โอวัลบูมิน ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล 40% เมื่อคำนวณจาก peak area (chromatogram c) พบว่า ได้รับความบริสุทธิ์ประมาณ 41.5 % ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลโครมาโตแกรมของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของโอวัลบูมินที่ได้จากวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล (ethanol precipitation) (B) และ ovalbumin commercial (A)

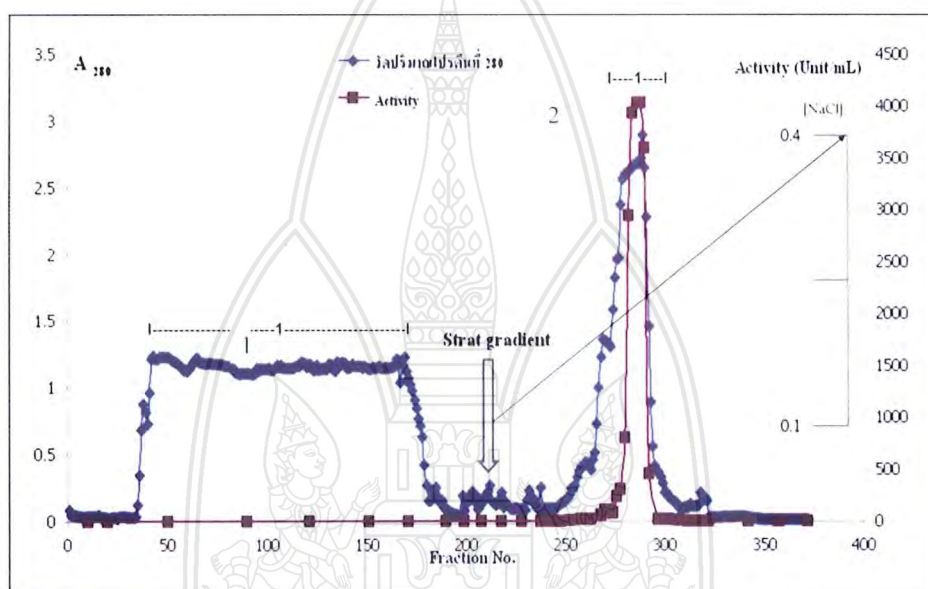
2.4 ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ด้วยเทคนิค Column Chromatography

การแยกบริสุทธิ์เพิ่มเติมไลโซไซม์ด้วยวิธี column chromatography นั้นจะใช้ CM - Toyopearl 650 M cation exchanger resin เมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 จะส่งผลทำให้เรซินมีประจุเป็นลบ

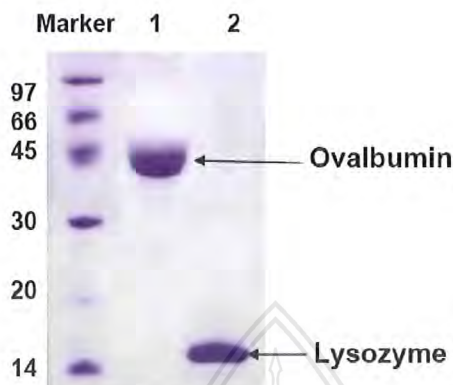
ส่วนไลโซไซม์นั้นมีค่า pI อยู่ที่ประมาณ 11 ที่ค่า pH ซึ่งต่ำกว่าค่า pI ของไลโซไซม์นี้จะทำให้โมเลกุลของไลโซไซม์มีประจุสุทธิเป็นบวกแล้วถูกจับอยู่กับคอลัมน์ จะเห็นได้ว่าที่ fraction ประมาณ 37-180 มีปริมาณโปรตีนสูงนั้นเป็นโอวัลบูมิน ซึ่งมีค่า pI ต่ำที่ประมาณ 4 เมื่อ pH ที่ใช้สูงกว่าค่า pI จึงแสดงประจุสุทธิเป็น

ลบและไม่ถูกจับอยู่กับเรซิน จึงหลุดออกมาก่อน เมื่อ นำไปทดสอบวัด activity ของไลโซไซม์ พบว่า ไม่มีการทำงานหรือการยับยั้งเกิดขึ้น แสดงว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพในการจับไลโซไซม์ได้ดี หลังจากนั้นจึง ทำการชะคอลัมน์ด้วยเกลือในระบบ linear gradient (0.1-0.4 M) ความแรงไอออนของเกลือ (NaCl) จะไป แย่งจับกับไลโซไซม์บนเรซินจึงทำให้ไลโซไซม์หลุด ออกมาจากคอลัมน์ได้ หลังจากนั้นนำแต่ละ fraction ไป

วัด activity พบว่า ไลโซไซม์ถูกแยกออกมาที่ความ เข้มข้นเกลือประมาณ 0.15-0.2 M ทำการเก็บ รวม fraction (pool fraction) ที่ fraction 270 - 300 ซึ่งมีการ ทำงานของไลโซไซม์สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ วัดได้ elution profile ของการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์ และ ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของโอวัลบูมินและ ไลโซไซม์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column Chromatography แสดงดังรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ



รูปที่ 4 แสดง elution profile ของการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ด้วย CM - Toyopearl 650 M cation exchanger chromatography 2.0 x 80 cm flow rate 15 ml/min ใช้ระบบการชะโปรตีนแบบ linear gradient โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือ 0.1 - 0.4 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0



รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 15% gel ของไลโซไซม์และโอวัลบูมิน จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cation exchanger chromatography โดย Marker คือ standard protein, lane ที่ 1-2 คือ pool fraction ที่ fraction 87-180 และ fraction 270 - 300 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิค cation exchanger chromatography สามารถที่จะแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ออกจากโอวัลบูมินได้ดียิ่งขึ้น โดยพบว่า pool fraction ของ fraction ที่ 87-180 (lane 1) นั้นมีแถบโปรตีนของโอวัลบูมินที่ประมาณ 45 kDa และ pool fraction ของ fraction ที่ 270-300 นั้นปรากฏเพียงแถบโปรตีนของไลโซไซม์ที่ประมาณ 14 kDa เท่านั้น โดยในขั้นตอนนี้ได้ค่า specific activity เพิ่มขึ้นเป็น 4,030.00 U/mg

3. สรุปผลการทดลอง

การแยกบริสุทธิ์โปรตีนโอวัลบูมินและไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล ร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟีนั้น วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นเอทานอล 40% (v/v) สามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์และโอวัลบูมินออกจากกันได้ดีในระดับหนึ่ง คือ ความบริสุทธิ์ประมาณ 61.8 % และ 41.5% ตามลำดับ เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผ่านคอลัมน์พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นเฉพาะไลโซไซม์จะมีค่า specific activity ที่เพิ่มขึ้นจาก 1,125.30 เป็น 4,030.00 U/mg โดยที่ทั้งสองวิธีของการแยกบริสุทธิ์

ไม่ทำให้ activity ของโปรตีนที่แยกได้นั้นสูญเสีย อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยต้นแบบที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมเพราะสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการศึกษายังมีต้นทุนที่สูง ในอนาคตผู้วิจัยจะพัฒนาขั้นตอนและศึกษาโดยใช้สารชนิดอื่นๆ ช่วยในการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้เหมาะสมกับโรงงานอุตสาหกรรมและลดต้นทุนการผลิตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกลุ่มวิจัยโปรตีนและโปรตีนโอมิิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*. 67: 833-848.
- Gill, A. O. and Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in

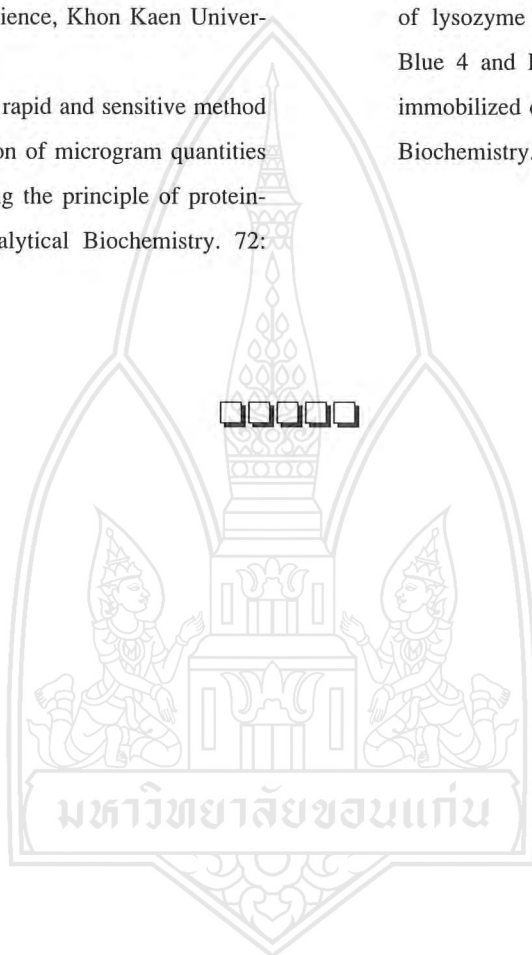
the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*. 80: 251-259.

Sirirat, L. (2009) Purification of ovalbumin and lysozyme from hen egg white by ethanol precipitation. A research project for degree of bachelor of Science, Khon Kaen University.

Bradford M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254

Guerin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Quiros del Bosque, A., Nau, F., and Croguennec, T. (2005). Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1090 (1): 58-67.

Yakup, A. M., Bayramoglu, G. (2003). Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilized composite membranes. *Process Biochemistry*. 40: 1433-1442.





ความหลากหลายของคลาโดเซอราในนาข้าว จังหวัดสงขลา

The Cladocera in Rice Fields in Songkhla Province

Supiyanit Maiphae ^{1*} and Phurichaya Janpriang ²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของคลาโดเซอราในนาข้าว 6 แหล่ง ในจังหวัดสงขลา เก็บตัวอย่างโดยการกรองน้ำปริมาตร 30 ลิตรผ่านถุงพลาสติกต่อนขนาด 60 ไมโครเมตร โดยเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 3 ครั้ง ระหว่างเดือนธันวาคม 2549 - มกราคม 2550 พบคลาโดเซอราทั้งสิ้น 38 ชนิด โดย Chydoridae เป็นวงศ์ที่พบความหลากหลายมากที่สุด (22 ชนิด) และ *Alona* เป็นสกุลที่พบความหลากหลายมากที่สุด (8 ชนิด) โดยชนิดที่มีความถี่ในการพบมาก คือ *Karualona iberica*, *Ephemeroporus barroisi*, *Macrothrix triserialis* และ *Pseudosida bidentata* ส่วน *Bosmina meridionalis*, *Alona affinis*, *A. cf. dentifera*, *Picripleuroxus laevis*, *Ilyocryptus spinifer* และ *Guernella raphaelis* เป็นชนิดที่พบในตัวอย่างเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น การพบความหลากหลายของคลาโดเซอรา และการพบชนิดที่พบได้ยากในนาข้าวของประเทศไทย แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแหล่งอาศัยย่อยและช่วงกว้างของการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในระยะเวลานั้นๆ ในนาข้าว อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อการอธิบายการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวต่อไป

Abstract

This study was aimed to study the species diversity of the Cladocera in six representative rice fields in Songkhla Province. Samples were quantitatively examined by filtering 30 liters of water through the 60 μ m mesh size plankton net during December 2006 - January 2007. A total of 38 cladoceran species were detected in six representative rice fields in Songkhla Province. Chydoridae was the most diverse family (22 species) and *Alona* was the most diverse genus (8 species). The frequently found cladoceran species were *Karualona iberica*, *Ephemeroporus barroisi*, *Macrothrix triserialis* and *Pseudosida bidentata*; while *Bosmina meridionalis*, *Alona affinis*, *A. cf. dentifera*, *Picripleuroxus laevis*, *Ilyocryptus spinifer* and *Guernella raphaelis* were present in only one sample. Relatively high species diversity and the presence of rare species in rice

¹ General Science Department and the Excellence Center for the Biodiversity of Peninsular Thailand (CBIPT), Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, Thailand, 90112

² General Science Department, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, Thailand, 90112

* Corresponding Author, E-mail: supiyanit.m@psu.ac.th

fields indicated that there are high diverse microhabitats and wide ranges of environmental factors in the rice fields. However, further studies are needed for these explanations.

คำสำคัญ : คลาโดเซอรา นาข้าว ประเทศไทย

Keywords : Cladocera, rice field, Thailand

Introduction

Knowledge on the Cladocera present in Thailand waters has progressed considerably during last two decades (Boonsom, 1984; Pholpunthin, 1997; Sirimongkonthaworn, 1997; Sanoamuang, 1998; Pipatcharoenchai, 2001; Saeng-aroon, 2001; Sa-artrit, 2002; Kotov and Sanoamuang, 2004; Sanoamuang and Faitacum, 2005; Kotov et al., 2005a,b; Sa-artrit and Beamish, 2005; Maiphae, 2005; Maiphae et al., 2005; 2008; Sinev et al., 2007; Korovchinsky and Sanoamuang, 2008). A total of 106 cladoceran species have been recorded from various types of freshwater habitats throughout Thailand (Maiphae et al., 2008) but there have been no report on the cladocerans detected in rice fields, which being one of Thailand's most important agricultural crops. This habitat is usually a temporary aquatic environment subject to large variations of insolation, temperature, pH, O₂ concentration, and nutrient status (Roger, 1996). Therefore, a specialized rice field fauna and community structure might be expected to result.

Thus the present study was aimed to expand and deepen our knowledge of cladoceran species diversity and their distribution in rice fields. This first attempt was focused on rice field sites in Songkhla province, Southeastern Thailand.

Materials and methods

a. Description of the study sites

The selected rice fields are located in Songkhla province, Southern Thailand (fig. 1). They can be divided into two cultivated types: paddy-sown field (R1) and fields where seedling rice is transplanted (R2-R6). The rice fields were submerged at the end of october with water coming from rains, and remained flooded without any intermediate phase of dryness until the end of january. During the study period, the water level covering the fields was about 5-30 cm. The descriptions of each rice field are in table 1.



Figure 1 Sampling sites in Songkhla Province.

Table 1 Description of the six sampling sites in Songkhla province.

Code	Characteristics
R1	paddy-sown field, with brown water, covered by macrophytes, with about 10-15 cm depth of water covering the field
R2	field covered by Leafy bladderwort and full of fish, shrimps and bivalves, with about 20-30 cm depth of water covering the field
R3	this site was sampled from the middle of a crop cycle to the harvesting period. The field was covered by leafy bladderwort and full of bivalves and shrimps with about 5-10 cm depth of water covering the field
R4	this site was sampled during the middle of a crop cycle, with about 20-30 cm depth of water covering the field
R5	field covered by several kinds of algae e.g. leafy bladderwort, coontail and <i>Hydrilla</i> and many bivalves and shrimps, with about 20-30 cm depth of water covering the field.
R6	brownish water, field covered by algae e.g. leafy bladderwort, with about 10-20 cm depth of water covering the field

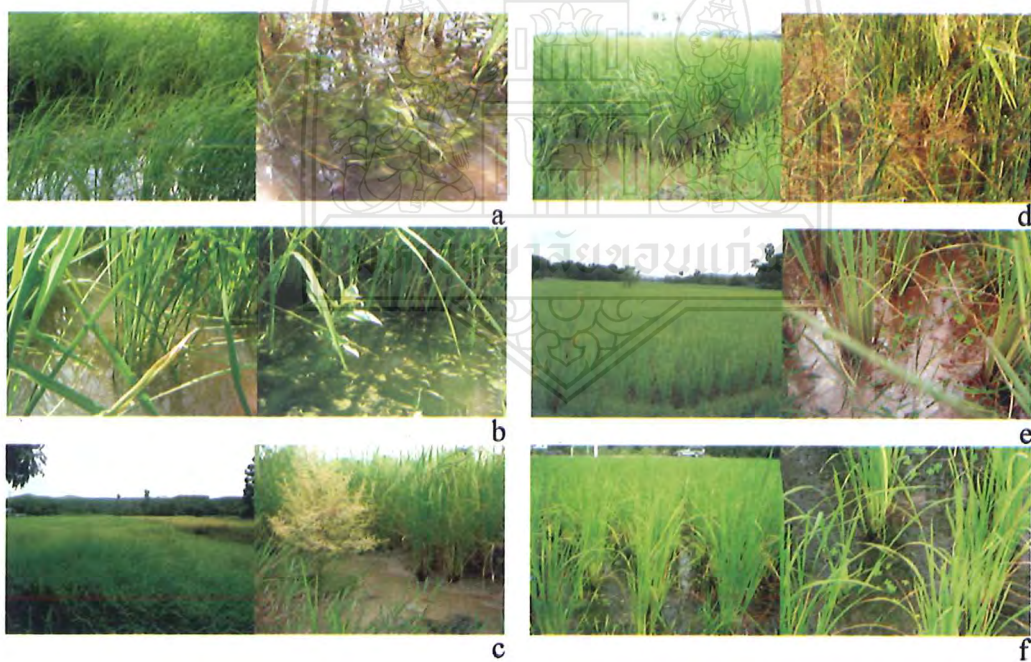


Figure 2 The sampling sites during sampling period; a = R1, b= R2, c= R3, d= R4, e= R5, f= R6

b. Cladoceran sampling and examination

There were three sampling times at bi-weekly intervals in the six rice fields (fig. 2) during December 2006 and January 2007. The samples were obtained from what was considered to be a representative environment in each rice field. They were quantitatively examined by filtering 30 liters of water through the 60 μm mesh size plankton net. Samples were immediately preserved with 70% alcohol. In the laboratory, cladoceran specimens were sorted using an Olympus dissecting microscope and identified to species level using an Olympus CH-2 compound microscope.

Results and discussion

A total of 38 cladoceran species in 24 genera and six families were recorded (table 2). This number is account for about 36% of the total species found in Thailand (Maiphae et al., 2008). This number is higher than the records from the rice fields in Pathumthani province, Thailand (11 species) (Chittapun, personal communication), Penang, Malaysia (26 species) (Ali, 1990), Zelata rice field, Italy (16 species) (Lonei et al., 1999) and Bigliana rice field, northern Italy (26 species) (Ferrari et al., 1991). The specific characteristics of each rice field may be one explanation for the differences of species diversity. Traditional rice fields (present study), cultivated for many years, might be considered to be climax communities. In addition, Fernando (1993) anticipated a decrease in species diversity under intensified rice cultivation because of the frequent disturbances to the ecosystem by mechanization and utilization of pesticides and the disappearance of marshes and ponds in the vicinity of the fields. Comparing these rice field habitats to other types of

habitat the species richness of the single site in the rice fields is comparable to the records from other types of habitats such as streams (Sa-artrit and Beamish, 2005), peat swamp, swamp and marsh (Maiphae, 2005, Maiphae et al., 2005). In addition, the observed species numbers in the present study was only slightly less than the proposed upper limit of 50-55 species of cladocera per lake (Dumont and Segers, 1996). However, it is expected that more species would be obtained from this freshwater habitat since the present investigation included only three samples over a 60 days period during a late time in the crop cycle. Moreover, the period of the study is also influenced the cladoceran diversity because the ecological characteristics, organism composition and environmental conditions, have been changed throughout the crop cycle. For examples, in early period of crop cycle, rice field is mostly covered with higher water level so it is mostly composed of planktonic cladocerans while the late of crop cycle rice field is mostly covered with vegetations so there is high proportion of littoral cladocerans. Consistent with the results from the present study, of which the cladoceran community was confined mostly to littoral species and the planktonic form was in the minority which was mostly present during the time of a high water level covering the field. However, this is in contrast to the report of Ferrari et al. (1991) who observed that planktonic species were present in comparable or even higher numbers than the littoral ones in an Italian rice field (Leoni et al., 1999).

Chydoridae was the most diverse family (22 species), followed by Daphniidae (5 species), Sididae (5 species), Macrothricidae (4 species) and Bosminidae and Ilyocryptidae (1 species each). Alona

was the most diverse genus (8 species) followed by Chydorus (4 species) and Macrothrix (3 species). The most frequently found cladoceran species (more than 80% of the samples) were *Ephemeroportus barroisi* (fig. 3a), *Karualona iberica* (fig. 3b), *Macrothrix triserialis* and *Pseudosida bidentata*. Hydrophyte abundance, especially in the late of crop cycle, may enabled them to exploit the habitats and possibly also rendered predation by fish on microcrustaceans ineffective (Ali, 1990). However, *Bosmina*

meridionalis, *Alona affinis*, *A. cf. dentifera*, *Picripleuroxus laevis*, *Ilyocryptus spinifer* and *Guernella raphaelis* were rare (occurring in only one sample). Moreover, within the cladocera, Daphniidae, especially *Daphnia*, are rarely found in Southeast Asia where their ecological surrogates include Bosminidae (Korovchinsky and Smirnov, 1996). Our observations in the rice fields in Songkhla province support this view where one species in Bosminidae were detected and there was no record of *Daphnia*.

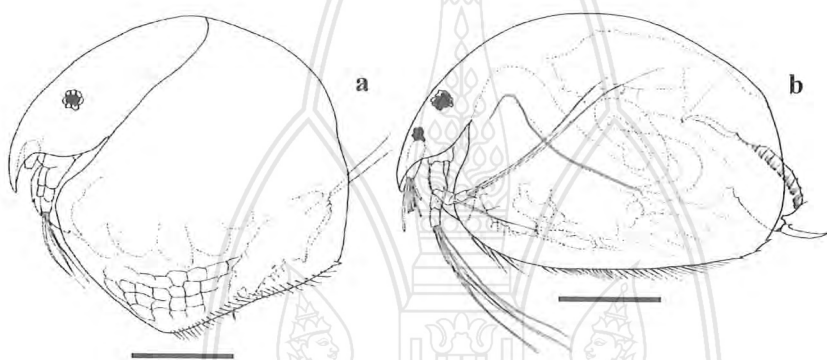


Figure 3 The representatives of the frequently found species in the present study: a; *Ephemeroportus barroisi* b; *Karualona iberica*. Scale bar denote 100 μ m.

The cumulative species number over the sampling period was highest at the third time of sampling in early January 2007 (35 species), followed by the second sampling time in late December 2006 (32 species) and the first sampling time in early December 2006 (30 species). Commonly, a rice growing cycle passes from an oligotrophic situation, typical of the initial phase of open water, to a final, eutrophic phase (Leoni et al. 1999). In parallel, there is a progressive increase in biological diversity and abundance of species. Our

observations support this view where species richness generally increases from early december to early january almost at all sites. The increase in species diversity throughout the rice growing cycle may resulted from changes of the nutrient composition, phytoplankton community, water level and maybe other factors such as pesticides, predator-prey relationships and interactions among zooplankton themselves (Ali, 1990), however, the explanations require further investigations.

Table 2 Cladoceran species found in the rice fields

[illegible]

Table 2. (continued).

Species/sites	R1			R2			R3			R4			R5			R6		
	eD	ID	eJ	eD	ID	eJ	eD	ID	eJ	eD	ID	eJ	eD	ID	eJ	eD	ID	eJ
Family Ilyocryptidae																		
29. <i>Ilyocryptus spinifer</i> (Herrick, 1882)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Family Macrothricidae																		
30. <i>Guernella raphaelis</i> (Richard, 1892)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31. <i>Macrothrix odiosa</i> (Gurney, 1916)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
32. <i>M. spinosa</i> (King, 1852)	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
33. <i>M. triserialis</i> (Brady, 1886)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Order Ctenopoda																		
Family Sidae																		
34. <i>Diaphanosoma excisum</i> (Sars, 1885)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
35. <i>Latonopsis australis</i> (Sars, 1888)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
36. <i>Pseudosida bidentata</i> (Herrick, 1884)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
37. <i>Sarsilatona serricauda</i> (Sars, 1901)	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
38. <i>Sida crystallina</i> (O.F.Muller, 1776)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total number of cladoceran species	14	13	11	15	20	16	15	18	22	11	14	12	17	16	15	12	13	16

Note: eD = early december, ID = late december, eJ = early january; - = not found + = found

Conclusion

The presence of relatively high cladoceran species diversity, 38 species, and the presence of rare species in Thailand such as *Alona* cf. *dentifera*, *Guernella raphaelis* and *Macrothrix odiosa* in the rice fields indicated that there are high diverse microhabitats in rice fields which enabled a number of cladoceran species to exploit the different microhabitats. In addition, high fluctuation of environmental factors during short period of the crop cycle might influence the presence and the composition of the cladocera. Of which, further studies on their diversity and composition in relation to environmental changes are necessary for these explanations.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Brian Hodgson, Faculty of Science, Prince of Songkla University for his critical reading of the manuscript and Dr. Supenya Chittapun, Thammasat University for comments on the first draft. This work was supported by a grant for a senior project, General Science Department, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai campus.

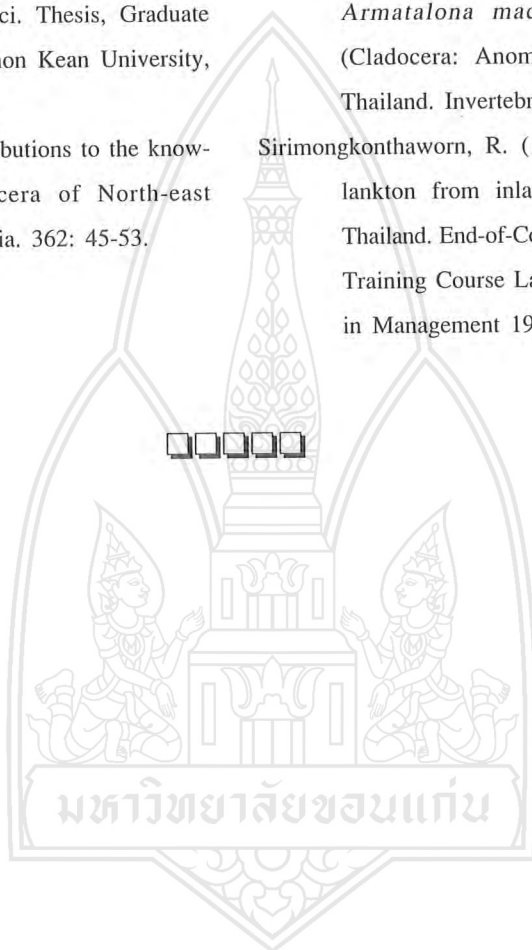
References

Ali, A. B. (1990). Seasonal dynamics of microcrustacean and rotifer communities in Malaysian rice fields used for rice-fish farming. *Hydrobiologia*. 206: 139-148.

Boonsom, J. (1984). The freshwater zooplankton of Thailand (Rotifera and Crustacea). *Hydrobiologia*. 113: 223-229.

- Dumont, H. J. and Segers, H. (1996). Estimating lacustrine zooplankton species richness and complementarity. *Hydrobiologia*. 341: 125-132.
- Fernando, C. H. (1993). Rice field ecology and fish culture-an overview. *Hydrobiologia*. 259: 91-113.
- Ferrari, I., Bachiorri, A., Margaritora, F. G. and Rossi, V. (1991). Succession of cladocerans in a Northern Italian rice field. *Hydrobiologia*. 225: 309-318.
- Korovchinsky, N. M. and Sanoamuang, L. (2008). Overview of Sididae (Crustacea: Cladocera: Ctenopoda) of Northeast and East Thailand, with description of a new species of the genus *Diaphanosoma*. *Zootaxa*. 1682: 45-61.
- Korovchinsky, N. M. and Smirnov, N. (1996). Introduction to the Cladocera (Daphniiformes, Polyphemiformes and Leptodoriiformes). Belgium: Universiteit Ghent, p. 157.
- Kotov, A. A. and Sanoamuang, L. (2004). *Ilyocryptus thailandensis* np. nov. (Cladocera: Anomopoda: Ilyocryptidae) from North Thailand. *International Review of Hydrobiology*. 89: 206-214.
- Kotov, A. A., Maiphae, S. and Sanamuang, L. (2005a). Revision of *Macrothrix paulensis*-like species (Anomopoda, Cladocera, Branchiopoda) in Asia, and phylogeny of the *paulensis*-group. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Monogr. Stud.* 151/3: 269-299.
- Kotov, A. A., Stifter, P. and Sanoamuang, L. (2005b). Notes on the genus *Ilyocryptus* Sars, 1862 (Cladocera: Anomopoda: Ilyocryptidae). *Ilyocryptus isanensis* sp.n. from Northeast Thailand. *Arthropoda Selecta*. 14: 229-239.
- Leoni, B., Cotta-Ramusino, M. and Margaritora, F. G. (1999). Seasonal succession of cladocerans in a rice field in Italy. *Hydrobiologia*. 391: 241-247.
- Maiphae, S. (2005). Taxonomy and biogeography of the Cladocera from Southern Thailand, with specific reference to *Alona* Baird, 1843 and *Macrothrix* Baird, 1843. Ph.D. Thesis Prince of Songkla University. p. 314.
- Maiphae, S., Pholpunthin, P. and Dumont, H. J. (2005). Species richness of the Cladocera (Branchiopoda: Anomopoda and Ctenopoda) in Southern Thailand, and its complementarity with neighboring regions. *Hydrobiologia*. 537: 147-156.
- Maiphae, S., Pholpunthin, P. and Dumont, H. J. (2008). Taxon richness and biogeography of the Cladocera (Crustacea: Anomopoda, Ctenopoda) in Thailand. *International Journal of Limnology*. 44 (1): 33-43.
- Pholpunthin, P. (1997). Freshwater zooplankton (Rotifera, Cladocera and Copepoda) from Thale-noi, South Thailand. *Journal Science Society of Thailand*. 23: 23-34.
- Pipatcharoenchai, W. (2001). Diversity of zooplankton in Changwat Kanchanaburi. Thesis. Kasetsart University. (in Thai).
- Roger, P. A. (1996). Biology and Management Flood-water Ecosystem in Ricefields. *International Rice Research Institute*. P. O. Box 933, Manila 1099, Philippines. p. 250.
- Sa-artrit, P. (2002). Diversity and distribution of freshwater cladocera from Trang province. Thesis. Prince of Songkla University. (in Thai).

- Sa-ardrit, P. and Beamish, F. W. H. (2005). Cladocera diversity, abundance and habitat in Western Thailand stream. *Aquatic Ecology*. 39: 353-365.
- Saeng-aroon, C. (2001). Species diversity and abundance of Cladocera in Lake Kud-Thing, Nong Khai province. Ms. Sci. Thesis, Graduate School in Biology, Khon Kean University, Khon Kean, Thailand.
- Sanoamuang, L. (1998). Contributions to the knowledge of the Cladocera of North-east Thailand. *Hydrobiologia*. 362: 45-53.
- Sanoamuang, L. and Faitacum, S. (2005). Species diversity and distribution of cladocerans and copepods in the floodplain of the Mun River. *KKU Research Journal*. 10 (2): 106-113.
- Sinev A. Y., Nachai S. and Sanoamuang, L. (2007). Occurrence of the Australian cladoceran *Armatalona macrocopa* (Sars, 1894) (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) in Thailand. *Invertebr. Zool.* 4: 25-29.
- Sirimongkonhaworn, R. (1997). Freshwater zooplankton from inland waters in Northeast Thailand. End-of-Course Report. International Training Course Lake Zooplankton: A Tool in Management 1996-1997. 1-10.





คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกระด้าง

Lentinus polychrous Lev.

Nutritive Value of Hed Kradang

(*Lentinus polychrous* Lev.)

จันทพร ทองเอกแก้ว¹

บทคัดย่อ

เห็ดกระด้าง (*Lentinus polychrous* Lev.) จากจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ และอำนาจเจริญ ได้ถูกนำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เส้นใย เถ้า รวมถึงแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญ พบว่า เห็ดกระด้างมีความชื้นเป็นองค์ประกอบประมาณ 86.31% มีปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เส้นใย และเถ้า ประมาณ 2.36 0.04 11.49 5.55 และ 1.36 กรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดสด ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และสังกะสี ในเห็ดกระด้างมีปริมาณ 4.23 151.59 5.08 1.07 14.17 และ 0.14 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดสด ตามลำดับ

Abstract

Nutritive value of Hed Kradang (*Lentinus polychrous* Lev.) from Ubon Ratchathanee, Srisaket and Amnat Charoen provinces were evaluated base on their nutrient compositions including moisture, protein, fat carbohydrate, fiber, ash and important elements. It was found that Hed Kradang contains moisture content about 86.31%. Crude protein, fat, carbohydrate, fiber and ash content were about 2.36, 0.04, 11.49, 5.55 and 1.36 g/100g of samples, respectively. Moreover, it contains the content of the important elements such as sodium, potassium, calcium, iron, magnesium and zinc about 4.23, 151.59, 5.08, 1.07, 14.17 and 0.14 mg/100g of samples, respectively.

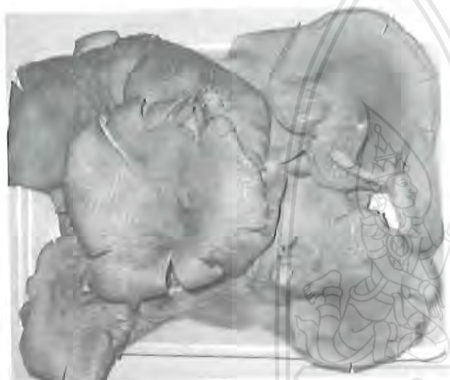
คำสำคัญ : คุณค่าทางโภชนาการ เห็ดกระด้าง *Lentinus polychrous* Lev. สารอาหาร แร่ธาตุที่สำคัญ

Keywords : Nutritive value, Hed Kradang, *Lentinus polychrous* Lev., Nutrient, Important elements

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

บทนำ

เห็ดกระด้าง หรือเห็ดบด หรือเห็ดลม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus polychrous* Lev. (Pegler, 1983) เป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่บนขอนไม้ที่ผุพัง พบทุกภาคของประเทศไทย เป็นเห็ดที่นิยมรับประทานกันมาก แถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะของดอกเห็ดกระด้างเป็นรูปกรวยลึก ก้านดอกสั้น ผิวดอกด้านบนมีขนละเอียดสีขาวนวลหรือสีน้ำตาล ด้านล่างมีครีบซึ่งติดกับโคนก้านดอก ขณะที่ดอกเห็ดอ่อนครีบบนมีสีครีมหรือน้ำตาลอ่อน เมื่อดอกเห็ดแก่หรือแห้งครีบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หมวกเห็ดมีความกว้างประมาณ 5-10 เซนติเมตร ก้านดอกยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร (อนงค์ จันทศรีกุล, 2539) แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 เห็ดกระด้าง (*Lentinus polychrous* Lev.)

สารอาหาร (nutrient) เป็นส่วนประกอบที่เป็นสารเคมีที่มีอยู่ในอาหาร เมื่อบริโภคเข้าไปแล้วร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ สารอาหารที่ร่างกายต้องการแบ่งเป็น 5 ประเภท คือ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ สำหรับคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน จัดเป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณมาก และเป็นสารที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย จึงเรียก “Macronutrients” หรือ “Fuel Nutrient” ส่วนวิตามินและแร่ธาตุเป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อยและไม่ให้พลังงาน จึงถูกเรียกว่า

“Micronutrient” (สิริพันธุ์ จุลกรังคะ, 2541) จากงานวิจัยของ Crisan และ Sands (1978) พบว่า เห็ดมีคุณค่าทางอาหารมากมายหลายชนิด เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ และมีส่วนที่เป็นกากปริมาณสูงเมื่อเทียบกับโดยน้ำหนักของเห็ดกับพืชผักบางชนิดที่ใช้เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ และจากการสำรวจปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในเห็ด พบว่า แร่ธาตุที่มีปริมาณมากที่สุด คือ โพแทสเซียม (potassium) รองลงมาคือ ฟอสฟอรัส (phosphorus) โซเดียม (sodium) และแมกนีเซียม (magnesium) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของ แร่ธาตุหลัก (major element) นอกจากนี้ ยังพบแร่ธาตุในเห็ดอยู่ในกลุ่มของแร่ธาตุรอง (minor element) ด้วยอันได้แก่ ทองแดง (copper) สังกะสี (zinc) เหล็ก (iron) แมงกานีส (manganese) โมลิบดีนัม (molybdenum) และแคดเมียม (cadmium) Bano และ Rajarathnam (1982) ได้รายงานไว้ว่า ในเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* จะมีปริมาณโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ประมาณ 56-70% ของปริมาณแห้งทั้งหมดในเห็ด และยังพบว่าโลหะหนักได้แก่ สังกะสีจะมีปริมาณสูงในเห็ดสกุล *Pleurotus* ทุกชนิด ในเห็ดกินได้นอกจากจะมีสารอาหารที่สำคัญและแร่ธาตุต่างๆ แล้ว ยังพบว่า โปรตีนในเห็ดมีกรดอะมิโนทุกชนิดเป็นองค์ประกอบ แม้ว่าจะมีปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดอยู่อย่างจำกัดก็ตาม จึงมีความแตกต่างจากโปรตีนจากแหล่งที่มีกรดอะมิโนเพียงบางชนิดเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น การรับประทานเห็ดกินได้ จะส่งผลให้ร่างกายได้รับสารอาหารประเภทโปรตีนที่มีประโยชน์มาก เนื่องจากร่างกายจะได้รับกรดอะมิโนทุกชนิด (สุนันท์ พงษ์สามารถ, 2526) นอกจากนี้ Chang และ Buswell (1996) ได้รายงานไว้ว่า เห็ดบางชนิดยังมีเอนไซม์สำคัญที่สามารถช่วยในการย่อยอาหาร และช่วยรักษาหรือบรรเทาอาการที่มีความรุนแรง เช่น ควบคุมเนื้องอก บำรุงหัวใจ ลดไขมัน ลดความดัน บำรุงส่วนประสาทและกล้ามเนื้อ เป็นต้น จากประโยชน์ทางคุณค่าทางอาหารที่สำคัญหลายชนิดของเห็ด อันประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต

เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ อีกทั้งยังสามารถเพาะได้จากวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ในระยะเวลาสั้น ทำให้นักวิจัยและนักโภชนาการได้ทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกินได้หลายชนิด แต่เนื่องจากจนถึงปัจจุบันนี้ข้อมูลที่แสดงถึงคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกินได้ที่มีอยู่ยังไม่สมบูรณ์ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ริเริ่มทำการวิจัยถึงคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกระด้าง เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางด้านโภชนาการ โดยจะสามารถนำมาใช้ในการประเมินคุณค่าทางโภชนาการ รวมทั้งปริมาณของแร่ธาตุที่สำคัญต่างๆ ที่ร่างกายควรได้รับ

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเห็ดกระด้าง

เก็บตัวอย่างเห็ดกระด้างจากแหล่งเพาะเห็ดในเขตอำเภอต่างๆ ในจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ และอำนาจเจริญ

การหาปริมาณความชื้น

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 5 กรัม ใส่ในกระชวยฟอยด์ แล้วนำไปอบในเครื่องอบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในภาชนะดูดความชื้น (desicators) บันทึกน้ำหนักแล้วนำไปอบต่ออีกนาน 1-2 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทำซ้ำจนกว่าจะได้น้ำหนักที่คงที่ น้ำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น

การหาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนได้ทำการทดลองตามวิธีของ Kjeldahl (1883) กล่าวคือ นำตัวอย่างเห็ดกระด้างสดจากแหล่งต่างๆ มาทำการย่อยในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง และเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น K_2SO_4 และ ซีลีเนียม (Se) จากนั้นย่อยตัวอย่างในเครื่องย่อยโปรตีน (Kjeldahl) ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นและ 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) นำไปกลั่นใน distillation system โดยมี 4%

กรดบอริก (H_3BO_3) และ 2 หยดของอินดิเคเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย 0.2% เมทิล-เรด (methyl-red) และ 0.1% เมทิลีนบลู (methyl-ene blue) ในขวดรูปชมพู่เป็นตัวรองรับ เมื่อแอมโมเนียถูกไล่ออกมาหมด จึงนำขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทกับ 0.1 N ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณไขมัน

นำตัวอย่างเห็ดกระด้างสดมาใส่ในทิมเบอร์ (thimble) และสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นทำการระเหย petroleum ether ออก นำส่วนไขมันที่เหลือมาอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณไขมันในตัวอย่งเห็ด โดยวิธี Soxhlet Extraction (Baker, 1984)

การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

นำตัวอย่างเห็ดกระด้างสดที่เหลือจากการสกัดไขมันมาเติมกรด HCl เข้มข้นและรีฟลักซ์ (reflux) นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปกรอง นำส่วนน้ำที่ได้เจือจาง 10 เท่า และเติม 5% ฟีนอล (phenol) และกรด H_2SO_4 เข้มข้น นำสารละลายที่ได้ไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีการเขย่าตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ คำนวณหาร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในตัวอย่างเห็ด ตามวิธี Phenol sulfuric acid (Porile, 1987)

การหาปริมาณเส้นใยอาหาร

นำตัวอย่างเห็ดกระด้างสดมาเติม 1.25% H_2SO_4 และรีฟลักซ์ 30 นาที กรองด้วยน้ำเดือดให้ปราศจากกรด นำกากที่ได้ใส่ในขวดก้นกลม เติม 1.25% NaOH และรีฟลักซ์ต่ออีก 30 นาที กรองด้วยน้ำเดือด นำส่วนที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ คำนวณหาร้อยละของเส้นใยอาหารตามวิธีของ Van Soest et al. (1991)

การหาปริมาณเถ้า

นำตัวอย่างเห็ดกระด้างสดมาใส่ใน porcelain crucible ที่สะอาด ชั่งน้ำหนักไว้ นำตัวอย่างเห็ดไปทำให้เป็นเถ้าด้วยการเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จนกระทั่งเถ้าเป็นสีขาว ทิ้งให้เย็นใน desiccators แล้วชั่งน้ำหนักไว้ คำนวณหาปริมาณเถ้า ตามวิธี AOAC (1990)

การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ

การวิเคราะห์แร่ธาตุ ทำโดยวิธี Atomic Absorption โดยการนำเถ้าของเห็ดแต่ละตัวอย่างมาละลายด้วย 2 N HCl นำสารละลายที่ได้ไปอุ่นบนเตาให้ความร้อน กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลาย

ที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นชนิดปราศจากแร่ธาตุจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่า เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกที่มีฝาปิด นำไปตรวจสอบแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และสังกะสี ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ตามวิธีของ Willard et al. (2001)

ผลการทดลอง

ตัวอย่างเห็ดกระด้างที่นำมาทำการทดลองได้จากแหล่งเพาะเห็ด ในเขตอำเภอต่างๆ ในจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ และอำนาจเจริญจำนวนทั้งหมด 14 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างเห็ดกระด้างที่ได้จากแหล่งต่างๆ

ลำดับ	สถานที่	ลำดับ	สถานที่
1	อ. เมือง จ. อุบลราชธานี	8	อ. สำโรง จ. อุบลราชธานี
2	อ. กุดข้าวปุ้น จ. อุบลราชธานี	9	อ. กันทรลักษ์ จ. ศรีสะเกษ
3	อ. เฉลิมสุข จ. อุบลราชธานี	10	อ. กันทรามย์ จ. ศรีสะเกษ
4	อ. นาเยีย จ. อุบลราชธานี	11	อ. พยุห์ จ. ศรีสะเกษ
5	อ. พิบูลมังสาหาร จ. อุบลราชธานี	12	อ. ศรีรัตนะ จ. ศรีสะเกษ
6	อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี	13	อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ
7	อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี	14	อ. ลืออำนาจ จ. อำนาจเจริญ

ปริมาณความชื้น สารอาหาร เส้นใยและเถ้า ปริมาณความชื้น (ปริมาณน้ำ) ของตัวอย่างเห็ดกระด้างสดที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่าเห็ดกระด้างสดมีความชื้นเป็นองค์ประกอบประมาณ 86.31% จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารของตัวอย่างเห็ดกระด้างสด ได้แก่ โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl ไขมันด้วยวิธี Soxhlet และคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol sulfuric acid

พบว่าเห็ดกระด้างสดมีปริมาณโปรตีนประมาณ 2.36 ไขมันประมาณ 0.04 และคาร์โบไฮเดรตประมาณ 11.49 กรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดสด ตามลำดับ ส่วนปริมาณเส้นใยของตัวอย่างเห็ดกระด้างสดที่วิเคราะห์ด้วยวิธีฟลัก พบว่ามีเส้นใยประมาณ 5.55 และมีปริมาณเถ้าประมาณ 1.36 กรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดสด ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณปริมาณความชื้น สารอาหาร เส้นใยและเถ้าของเห็ดกระด้างสด (กรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดส่วนที่กินได้)

ตัวอย่างเห็ด	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เส้นใย	เถ้า
เห็ดกระด้าง	86.31±1.36	2.36±0.17	0.04±0.004	11.49±0.57	5.55±0.25	1.36±0.04

ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่

โซเดียม โปตัสเซียม แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม

และสังกะสีในตัวอย่างเห็ดกระด้างสด ด้วยวิธี Atomic

Absorption พบว่าเห็ดกระด้างสดมีปริมาณแร่ธาตุต่างๆ

ประมาณ 4.23 151.59 5.08 1.07 14.17 และ 0.14

มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดสด ตามลำดับ สรุปดัง

ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณแร่ธาตุต่างๆของเห็ดกระด้างสด (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเห็ดส่วนที่กินได้)

ตัวอย่างเห็ด	โซเดียม	โปตัสเซียม	แคลเซียม	เหล็ก	แมกนีเซียม	สังกะสี
เห็ดกระด้าง	4.23±0.1	151.59±0.54	5.08±0.27	1.07±0.04	14.17±0.18	0.14±0.0

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร รวมถึงแร่ธาตุในเห็ดกระด้างสดในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ และอำนาจเจริญ พบว่า เห็ดกระด้างสดมีสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน ใกล้เคียงกับเห็ดหอม เห็ดเป๋อชื่อ และเห็ดนางรม ซึ่งมีปริมาณ โปรตีนประมาณ 2.19 2.22 และ 2.13 กรัม ตามลำดับ (สุนันท์ พงษ์สามารถ, 2526) มีคาร์โบไฮเดรต ใกล้เคียงกับเห็ดตีนแรดที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตประมาณ 10.02 กรัม (สุนันท์ พงษ์สามารถ, 2526) และที่น่าสนใจคือปริมาณไขมันจะมีปริมาณต่ำกว่าเห็ดกินได้ชนิดอื่นๆ ส่วนปริมาณเส้นใยและเถ้าจะมีปริมาณที่สูงกว่าเห็ดกินได้ชนิดอื่นๆ ที่ได้ทำการรายงานโดย สุนันท์ พงษ์สามารถ (2526) นอกจากนี้ยังพบว่า เห็ดกระด้างยังเป็นแหล่งของอาหารชนิดหนึ่งที่มีปริมาณของแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ โซเดียม โปตัสเซียม แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และสังกะสีในปริมาณที่ใกล้เคียงกับเห็ดกินได้หลายชนิด ได้แก่ เห็ดหอม เห็ดฟาง

เห็ดนางรม เห็ดตับเต่า ที่มีการรายงานโดย สุนันท์ พงษ์สามารถ (2526) จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าเห็ดกระด้างมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์หลายชนิดและมีส่วนที่เป็นเส้นใยในปริมาณสูง ดังนั้น ข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านโภชนาการที่ได้รับจากเห็ดกระด้าง อันจะนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการประเมินคุณค่าทางโภชนาการที่ร่างกายควรได้รับต่อไป ดังนั้น หากรับประทานเห็ดชนิดนี้ร่วมกับอาหารที่มีประโยชน์ชนิดอื่นๆ ก็จะทำให้ร่างกายได้รับสารอาหารที่มีประโยชน์มากยิ่งขึ้น อันจะเป็นการส่งเสริมให้สุขภาพร่างกายของมนุษย์ดีขึ้นด้วย เพราะการสารอาหารและแร่ธาตุที่สำคัญบางชนิด จะส่งผลให้เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคโลหิตจาง โรคหัวใจ และมะเร็งบางชนิด นอกจากนี้ แร่ธาตุยังมีบทบาทสำคัญในเด็ก โดยจะช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการด้านสมองที่ดีขึ้น และทำให้ภูมิคุ้มกันโรคเป็นปกติ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำหรับการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ในปีงบประมาณ 2544 ขอขอบคุณ คุณรัตนพร ทิวะพล คุณวันเพ็ญ กาคำสุข คุณกาญจนา พิพัฒน์ และ คุณวันทะนีย์ สิมพระภักย์ สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการให้ความสะดวกระหว่างการทำวิจัยและทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- สิริพันธุ์ จุลกรังคะ. 2541. สารอาหาร. โภชนาศาสตร์เบื้องต้น. หน้า 47 - 95.
- สุนันท์ พงษ์สามารถ. 2526. การสำรวจคุณค่าอาหารของเห็ด. รายงานการวิจัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 8 - 14.
- อนงค์ จันทศรีกุล. 2539. เห็ดกระด้าง. เห็ดเมืองไทย. หน้า 21 - 22.
- AOAC, (1990). Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Analytical Chemists. Washington DC.
- Baker, D. (1984). Fat in Flour, acid analysis method. In: Official Method of Analysis of the AOAC (William S. ed., 14th ed.) Virginia: The William Byrd Press. Inc. pp. 251-252.
- Bano, Z and Rajarathnam, S. (1982). Studies on the cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. Mushroom Journal. 115: 243-246.
- Chang, S. T. and Buswell, J. A. (1996). Mushroom nutraceuticals. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 12: 473-476.
- Crisan, E. V. and Sands, A. (1978). Nutritional value. In: S. T. Chang and W. A. Hayes, Editors, The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms, New York: Academic Press, pp. 137-168.
- Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern, Z. Anal. Chem. 22: 366-382
- Pegler, D. N. (1983). The genus *Lentinus*. A world Monograph. Kew. Bull. Addit. Ser.10: 1-281.
- Porile, N. T. (1987). Carbohydrates. Modern University chemistry, Harcourt Brace Jovanovich San Diego: pp. 856 - 857.
- Willard, H. H., Merritt, L. L. and Dean, J. A. (2001). Laboratory Work. Instrumental Methods of Analysis, New York: pp. 105-106.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A., (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.





Effect of Additive Substances and Planting Substrate on Growth Development of *Aerides houlletiana* Rchb. f. Seedling by Tissue Culture

Somporn Prasertsongsun ^{1*} Rosemina Awaesuemae ¹

บทคัดย่อ

นำต้นกล้ากล้วยไม้กุหลาบเหลืองโคราช (*Aerides houlletiana* Rchb.f.) มาวางเลี้ยงในอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ที่เติมสารเติมแต่ง ได้แก่ กล้วย มันฝรั่ง และมะเขือเทศ เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมกล้วย 100 กรัมต่อลิตร ให้การเจริญเติบโตของกล้วยไม้มากกว่าการเติมสารเติมแต่งชนิดอื่นๆ โดยพบว่า กล้วยไม้กุหลาบเหลืองโคราชมีจำนวนราก 4.00 ราก/ต้น ความสูง 0.82 เซนติเมตร/ต้น และน้ำหนักสด 0.95 กรัม/ต้น เมื่อย้ายต้นกล้าออกปลูกในวัสดุปลูกต่างๆ สภาพการเลี้ยงในเรือนอนุบาลต้น ไม้ภายใต้อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายปลูก คือ ถ่านผสมกาบมะพร้าวอัตราส่วน 1:1

Abstract

Seedlings of *Aerides houlletiana* Rchb.f. were cultured on VW medium (Vacin and Went, 1949) medium supplemented with additive substances, namely, banana, potato and tomato. All cultures were incubated at 25±2°C under the cool white fluorescent light at intensity of 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 16 h. VW medium supplemented with 100 g/l of banana was proved to be more beneficial to the growth of the orchid than other additive substances. It significantly yielded per cultured plant, the highest average number of roots (4.00 roots/plantlet), shoot length (0.82 cm/plantlet) and fresh weight (0.95 gm/plantlet). Seedlings of this orchid were transferred from the medium to the pots of planting substances and maintained in the nursery at 25-35°C with relative humidity of 60-80% for 8 weeks. Charcoal mixed with coconut coat (1:1) was the optimum substrate for transplantation of *A. houlletiana* Rchb.f. seedling.

¹ Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani, Thailand 94000

* Corresponding Author, E-mail: psomporn@bunga.pn.psu.ac.th

Introduction

Aerides is a genus containing more than 60 species of monopodial epiphytes of lithophytes. Many of the species are often known as foxtailed orchids. There are wide possibilities to produce interspecific hybrids in this genus (Bose and Bhattacharjee, 1980). Thailand is one of many countries that is situated in a region with abundance of native wild orchids. *Aerides houlletiana* Rchb.f. widely distributes in Northern Thailand. It was occurs at Nakorn Ratchasima and the local name is Kulap Lueang Korat. Nowaday, *A. houlletiana* Rchb.f. decline due to destruction of natural forest. Therefore, it is essential to take measures for the conservation and propagation of this orchid. There have been many reports on micropropagation of orchids using tissue culture. For example, *A. crispum* was propagated using protocorm and leaf section (Sheelavanthmath et al. 2005). Rungruchkanot (1996) has also investigated seed germination and plant growth development of *A. houlletiana* Rchb.f. and *Acampe rigida*. However, there have not been any report of transplantation. Therefore, in this research banana, potato, tomato were used as additive substances in the culture medium for commercial orchid propagation by tissue culture and developed an appropriate in vitro method for transplantation of *A. houlletiana* Rchb.f.

Materials and Methods

The pods of *Aerides houlletiana* Rchb.f. collected from Nakorn Ratchasima province, Thailand. The pods were surface sterilized with soap and water, then were dipped in 95% ethanol and flamed in a short period for three times. Seeds were scraped from the placentae and put on the Vacin

and Went (VW) culture medium with 2.0% sucrose, 0.8% agar, 150 ml/l coconut water and 0.5 g/l activated charcoal. They were then cultured in the darkness at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. After 5 weeks, all seeds germinated in darkness moved to light condition for further development.

One year-old of *A. houlletiana* Rchb.f. plants, grown in vitro from seeds were used as explants for micropropagation. The 30 seedlings of *A. houlletiana* Rchb.f. were cultured in Vacin and Went medium with different additive substances, including 100 g/l banana, potato, tomato and a mixing of these substances.

Each experimental contained 30 explants was performed in a complete randomize design and repeated twice. The *in vitro* growth of plants, including the number of the leaves, root, shoot, the length of shoot and the fresh weight (FW) were measured after culturing for 12 weeks. All data were analyzed by ANOVA and mean values were compared using Duncan's multiple range test (DMRT) at 5% significant level.

Seedlings were washed with water for three times to remove the residual medium and transplanted to pots containing coconut coat, charcoal, charcoal mixed with coconut coat (1:1) and no planting substrate. The seedlings were grown in the green house with controlling of temperature at $25-35^\circ\text{C}$ and humidity of 60-80%.

Results and discussion

Seeds of *A. houlletiana* Rchb.f. began to germinate after culturing for four weeks. The color of protocorms was pale yellow. After five weeks, germinated seeds were moved to the light condition for further development. Three additive substances,

namely, banana, tomato and potato were applied to *A. houlettiana* Rchb.f. seedling. It was formed that all three additive substances had incorporated effect on growth and development of seedling. The medium supplemented with banana gave better growth than those with other additive substances. The stems of this orchid are cylindrical leafy, often branched with aerial roots (Table 1 and Figure 1). This result indicated that banana was the most effective factor to promote the growth of *A. houlettiana* Rchb.f. because banana contained cytokinin, auxin and gib-

berellins. Moreover, banana acts as buffer in culture media (Arditti, 1968) (Vyas et al., 2009) reported that Knudson C medium supplemented with banana extract enhanced germination and regeneration of *Dendrobium litiuiflorum* Lindl. However, tomato has vitamin C, K, mineral nutrients and lycopene that affect the growth development of cells. The presense of nicotinic acid and niacin in potato which can induce the synthesis of NAD and NADP causing better growth of seedling (Arditt, 1966).

Table 1 The effect of different additive substances on growth of *A. houlettiana* seedling cultured on VW medium.

Additive substances	Average no. of leaves	Average no. of root	Average no. of shoot	Shoot length (cm)	Fresh weight (g)
No additive	1.25±0.40a	1.95±0.45b	0.15±0.08a	0.47±0.60b	0.47±0.09b
Banana	1.44±0.32a	4.00±0.33a	0.00±0.00a	0.82±0.10a	0.95±0.11a
Potato	2.07±0.28a	2.10±0.31b	0.24±0.09a	0.45±0.60b	0.52±0.09b
Tomato	1.50±0.42a	2.77±0.36b	0.23±0.13a	0.79±0.10a	0.83±0.17ab
Potato, tomato mixed with banana	1.96±0.20a	2.07±0.32b	0.04±0.04a	0.56±0.04ab	0.53±0.09b

Each value represented the mean +SE of culture for 12 weeks. The different letters indicated replicated explants which were recorded after significant different at $p < 0.05$ by DMRT.



Figure 1 The effect of additive substances on growth of *A. houlettiana* Rchb.f. seedling cultured on VW medium. From left to right, banana, potato, tomato, the mixing of banana, potato, tomato and no additive.

The absence of additive substance in the medium showed small seedlings with shoot and root, whereas the medium with additive substances resulted in bigger size of seedling. However, all medium supplemented with activated charcoal could improve aeration and absorbed phenolic compounds and also effected on the growth (Paek and Yeung, 1991).

After culturing for 12 weeks, seedlings of *A. houlettiana* Rchb.f. with fully expanded leaves and well developed roots were transferred to planting substrates for 8 weeks of the four different types of planting substrates examined, the percentage of survival seedlings without planting substrate yielded the highest percentage of survival rate. (Table 2).

However, there was no statistical difference among given planting substrates. Seedling in charcoal mixed with coconut coat (1:1) seemed to be greener and healthy than the others (Figure 2). Planting substrate is an important factor for transplantation. It can improve water uptake and support root development (Dressler, 1981). This present study shows that charcoal mixed with coconut coat (1:1) plays not a significant on shoot length and percentage of survival with no planting substrate. Consequently, the results suggest that charcoal mixed with coconut coat (1:1) was sufficient to transplantation of *A. houlettiana* Rchb.f. Charcoal and coconut coat are available and low cost.

Table 2 Effect of planting substrate on transplantation of *A. houlettiana* Rchb.f.

Planting substrate	Shoot length (cm)	Survival (%)
Coconut coat	0.36±0.64a	64±0.10b
Charcoal	0.31±0.15a	40±0.11a
Charcoal mixed with coconut coat (1:1)	0.24±0.05a	72±0.10b
No planting substrate	0.42±0.04a	84±0.10b

Each value represented the mean +SE of replicated explants which were recorded after culture for 8 weeks. The different letters indicated significant different at $p < 0.05$ by DMRT.



Figure 2 Effect of planting substrate on transplantation of *A. houlettiana* Rchb.f. From top to bottom, charcoal, coconutcoat, no planting substrate and charcoal mixed with coconut coat (1:1).

Acknowledgement

The authors would like to express our sincere gratitude to Asst. Prof. Dr. Naiyana Srichai from Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus for kindly providing seeds of *A. houlletiana* Rchb.f. This work was supported by Biology Section, Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus, Thailand.

References

- Arditti, J. (1966). The effects of niacin, adenine, ribose and niacinamide coenzyme on germinating orchid seeds and young seedling. *American*. 35: 892-898.
- Arditti, J. (1968). Germination and growth of orchids on banana fruit tissue and some of its benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 24: 65-71.
- Bose, T. K. and Bhattacharjee, S. K. (1980). Orchids of India. Calcutta: Naya Prokash 49-60 extracts. *American Orchid Society Bulletin*. 37: 112-116.
- Dressler, R. I. (1981). Introduction. <http://www.orchidlady.com>. Cited 21 Aug 2006.
- Paek, K. Y. and Yeung, E. C. (1991). The effects of 1-naphthalene acetic acid and N⁶-protocorm like bodies (PLB) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulturae*. 106: 395-401.
- Rungruchkanot, K. (1996). Studies of seed germination and plant growth development of Thai Wild Orchid, *Aerides houlletian* and *Acampe rigida*. M.S. Thesis, University of Mahidol.
- Sheelavanthmath, S. S., Murthy, H. N., Hema, B. P., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2005). High frequency of thai wide orchid, *Aerides houlletiana* and *Acampe rigida*. Dissertation, Mahidol University.
- Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH change in nutrient solution. *Botan Gaz.* 110: 605-613.
- Vyas, S., Guha, S., Bhattacharya, M. and Rao, I. U. (2009). Rapid regeneration of plants of *Dendrobium litiuiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Scientia Horticulturae*. 121: 32-37.





ผลของเจลาตินและกรดซิตริก ต่อคุณภาพทาง

ประสาทสัมผัสของกัมมีเยลลี่รสตะไคร้

Effect of Gelatin and Citric Acid on Sensory Quality of Lemongrass Flavored Gummy Jelly

เฉลิมพล ธนอมวงศ์¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเจลาตินและปริมาณกรดซิตริกต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกัมมีเยลลี่รสตะไคร้ โดยศึกษาปริมาณเจลาติน (X_1) และความเข้มข้นของกรดซิตริก (X_2) วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) การทดสอบคะแนนความเข้ม (intensity scores) ของกัมมีเยลลี่รสตะไคร้ จำนวน 9 ตัวอย่าง ประมวลผลด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) พบว่า แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าความยืดหยุ่น (springiness) ความแข็ง (hardness) และความยากในการเคี้ยว (chewiness) มีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 และมีค่า $R^2 > 0.7$ โดยเมื่อปริมาณเจลาตินเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ค่าความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยวเพิ่มขึ้น การทดสอบคะแนนความชอบ (hedonic score) พบว่า กัมมีเยลลี่รสตะไคร้ที่มีปริมาณเจลาตินร้อยละ 8 มีค่าคะแนนความชอบด้านความยืดหยุ่น ความแข็ง ความยากในการเคี้ยว และความชอบโดยรวม (overall liking) เท่ากับ ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง

Abstract

This research was to study the effect of gelatin and citric acid content on sensory quality of lemongrass flavored gummy jelly (studied on gelatin content (X_1) and citric acid concentration (X_2)). Experimental design was Central composite design (CCD). Intensity scores of 9 samples lemongrass flavored gummy jelly product was evaluated using response surface methodology (RSM). The results showed that the empirical models for springiness, hardness and chewiness acceptability scores were significantly different ($p < 0.05$) with $R^2 > 0.7$. Springiness, hardness and chewiness increased as the gelatin content increased. From hedonic score showed that springiness, hardness, chewiness and overall liking of lemongrass flavored gummy jelly product by using 8% gelatin was like slightly to like moderately

คำสำคัญ : กัมมีเยลลี่ รสตะไคร้

Keywords : Gummy jelly, Lemongrass

¹ หลักสูตรเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา พิชญโลภ 65000

คำนำ

กัมมีเยลลี่จัดเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทลูกกวาดซึ่งมีส่วนแบ่งตลาดประมาณครึ่งหนึ่งของตลาดลูกกวาดในประเทศไทย และกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากผู้บริโภคจะนิยมกับผลิตภัณฑ์ที่สามารถเคี้ยวได้ (สุวรรณ สุภิมารส, 2543) โดยส่วนประกอบหลักของกัมมีเยลลี่ ประกอบด้วย น้ำผลไม้ น้ำตาล กรด และสารที่ทำให้เกิดเจล ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้จะมีผลโดยตรงต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กัมมีเยลลี่ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณเจลาตินและความเข้มข้นของกรดซิตริกที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เนื้อสัมผัส

ที่ดี เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์กัมมีเยลลี่รสตะไคร้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กัมมีเยลลี่รสตะไคร้ตามสูตรที่ดัดแปลงจากสูตรพื้นฐานกัมมีเยลลี่ (Garcia, 2000) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ เจลาติน 250 Bloom (หจก.โอวี เคมีคัล แอนด์ ซัพพลาย) น้ำ น้ำตาลซูโครส กลูโคสไซรัปชนิด 42 DE (บริษัท นครหลวงกลูโคส จำกัด) และสารละลายกรดซิตริก โดยกรรมวิธีการผลิต ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กรรมวิธีการผลิตกัมมีเยลลี่ (ที่มา: Lees and Jackson, 1973)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design โดยมีปัจจัยที่จะทำการศึกษา 2 ปัจจัย 2 ระดับ (1, -1) คือ เจลาติน (x_1) เท่ากับร้อยละ 7 และ 8 โดยน้ำหนัก ความเข้มข้นของกรดซิตริก (x_2) เท่ากับร้อยละ 30 และ 50 (ปริมาณที่ใช้ในส่วนผสมเท่ากับร้อยละ 3.5 โดยน้ำหนัก)

จากการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design มีการทำซ้ำที่จุดศูนย์กลาง 5 ครั้ง จัดสิ่งทดลองได้ทั้งหมด 9 สิ่งทดลอง ดังตารางที่ 1 โดยแต่ละสิ่งทดลองจะสุ่มลำดับการผลิตโดยการจับสลาก ในการผลิตกัมมีเยลลี่รสตะไคร้จะปรับน้ำในส่วนที่ใช้ละลายน้ำตาลทรายกับกลูโคสไซรัปเพื่อให้ได้ปริมาณส่วนผสมในสูตรครบร้อยละ 100

ตารางที่ 1 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design

ลิ่งทดลอง	ตัวแปรเดิม		ตัวแปรเข้ารหัส	
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
1	7	30	-1	-1
2	7	50	-1	1
3	8	30	1	-1
4	8	50	1	1
5	7.5	40	0	0
6	7.5	40	0	0
7	7.5	40	0	0
8	7.5	40	0	0
9	7.5	40	0	0

หมายเหตุ : X₁ หมายถึง ปริมาณเจลาติน (ร้อยละ)
X₂ หมายถึง ความเข้มข้นของกรดซิตริก (ร้อยละ)

การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำกัมมีเอลีสรีสตะไคร้ที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส ดังนี้

การทดสอบคะแนนความเข้ม (intensity scores) (Meilgaard et al., 1990)

ด้านเนื้อสัมผัสในคุณลักษณะความยืดหยุ่น (springiness) ความแข็ง (hardness) และความยากในการเคี้ยว (chewiness) โดยใช้สเกล 15 เซนติเมตร (ชม.) และผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 12 คน

การทดสอบคะแนนความชอบ (hedonic score) (Meilgaard et al., 1990)

ด้านคุณลักษณะความยืดหยุ่น (springiness) ความแข็ง (hardness) ความยากในการเคี้ยว (chewiness) และความชอบโดยรวม (overall liking) โดยใช้วิธีการให้คะแนนความชอบ hedonic scaling 9 points กับผู้ทดสอบที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน (ผู้ทดสอบ 1 คน ทดสอบ 9 ตัวอย่าง)

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์โดยวิธี Response Surface Methodology (RSM) โดยสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์แบบ First-Order Model เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัส (y) กับปริมาณเจลาติน (x₁) และความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก (x₂) ดังนี้

Y = b0 + b₁x₁ + b₂x₂

วิเคราะห์ Regression เลือกแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 (p<0.05) นำมาสร้างกราฟ contour plot เพื่อหาจุดที่เหมาะสมของปริมาณเจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาผลของปริมาณเจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกต่อคุณภาพทาง

ประสาทสัมผัสโดยวิธีการให้คะแนนความเข้มโดยใช้สเกล 15 เซนติเมตร และใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 12 คน โดยกำหนดปัจจัยคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสซึ่งได้แก่ ความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยว พบว่า ปริมาณเจลลิตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกมีผลต่อคะแนนความเข้มของกัมมี่

เยลลีสตตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 2) ซึ่งกัมมี่เยลลีสตตะไคร้ที่มีปริมาณเจลลิตินร้อยละ 8 (T_3/T_4) มีค่าความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยวสูงที่สุด คือ 12.24/12.36 ซม. 12.09/12.30 ซม. และ 11.83/12.44 ซม. ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าคะแนนความเข้มของกัมมี่เยลลีสตตะไคร้

สิ่งทดลอง	ปัจจัย		คะแนนความเข้ม (เซนติเมตร)		
	เจลลิติน (ร้อยละ)	ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	ความยืดหยุ่น	ความแข็ง	ความยากในการเคี้ยว
1	7	30	9.43(0.61) ^d	8.21(0.22) ^d	8.84(0.54) ^d
2	7	50	9.64(0.49) ^d	8.58(0.41) ^{cd}	9.21(0.56) ^{cd}
3	8	30	12.24(0.43) ^{ab}	12.09(0.43) ^a	11.83(0.40) ^b
4	8	50	12.36(0.38) ^a	12.30(0.26) ^a	12.44(0.41) ^a
5	7.5	40	11.83(0.48) ^{bc}	9.03(0.83) ^{bc}	9.69(0.42) ^c
6	7.5	40	11.61(0.19) ^c	9.16(0.31) ^b	9.55(0.39) ^c
7	7.5	40	11.81(0.29) ^{bc}	8.99(0.48) ^{bc}	9.64(0.49) ^c
8	7.5	40	11.76(0.35) ^c	9.00(0.29) ^{bc}	9.59(0.36) ^c
9	7.5	40	11.83(0.37) ^{bc}	8.99(0.29) ^{bc}	9.60(0.37) ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล

เมื่อนำค่าคะแนนความเข้มด้าน ความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยวของกัมมี่เยลลีสตตะไคร้ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี RSM เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าคะแนนความเข้มกับปริมาณเจลลิตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก

พบว่า ความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากง่ายในการเคี้ยว มีความสัมพันธ์กับปริมาณเจลลิตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกค่อนข้างสูง ดังจะเห็นได้จากแบบจำลองคณิตศาสตร์มีค่า $R^2 > 0.7$ และมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 8 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าคะแนนความเข้มของกัมมีเซลล์รีสตะไคร้

ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R ²	Model significance
ความยืดหยุ่น (ชม.)	-9.7128+2.7688x ₁ +0.0084x ₂	0.716	0.000
ความแข็ง (ชม.)	-19.4819+3.8x ₁ +0.0144x ₂	0.743	0.000
ความยากในการเกี่ยว (ชม.)	-14.2427+3.1063x ₁ +0.0247x ₂	0.729	0.000

เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์ของคะแนนความเข้มนด้านความยืดหยุ่น มาสร้างกราฟ response surface (รูปที่ 2) พบว่า เมื่อปริมาณธาตุดินเพิ่มขึ้น

ค่าความยืดหยุ่นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดซิดริก พบว่า ค่าความยืดหยุ่นมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

รูปที่ 2 Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุดิน (ร้อยละ) กับ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซิดริก (ร้อยละ) ที่มีผลต่อค่าคะแนนความเข้มน ด้านความยืดหยุ่นของกัมมีเซลล์รีสตะไคร้

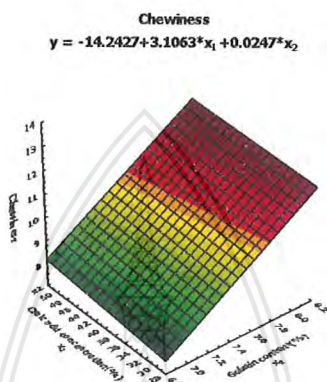
เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์ของคะแนนความเข้มนด้านความแข็ง มาสร้างกราฟ response surface (รูปที่ 3) พบว่า เมื่อปริมาณธาตุดินเพิ่มขึ้น

ค่าความแข็งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดซิดริก พบว่า ค่าความแข็งมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

รูปที่ 3 Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุดิน (ร้อยละ) กับความเข้มข้นของสารละลายกรดซิดริก (ร้อยละ) ที่มีผลต่อค่าคะแนนความเข้มน ด้านความแข็งของกัมมีเซลล์รีสตะไคร้

เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์ของคะแนนการเคี้ยวมาสร้างกราฟ response surface (รูปที่ 4) พบว่า เมื่อปริมาณเจลลิตินเพิ่มขึ้นค่าความยากง่ายใน

การเคี้ยวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก พบว่า ค่าการเคี้ยวมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก



รูปที่ 4 Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเจลลิติน (ร้อยละ) กับ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก (ร้อยละ) ที่มีผลต่อค่าคะแนนความเคี้ยว ด้านความยากในการเคี้ยวของกัมมีเซลลูล์รอสตะไคร้

จากกราฟ response surface ของค่าความยืดหยุ่นความแข็ง และการเคี้ยว มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเจลลิติน การเพิ่มปริมาณเจลลิตินจะมีผลต่อความแข็งแรงของเจล เมื่อเจลลิตินมากขึ้นความแข็งแรงของเจลจะมากขึ้นด้วย ซึ่งความแข็งแรงของเจลจะมีผลต่อค่า ความยืดหยุ่น ความแข็งแรง และการเคี้ยวของผลิตภัณฑ์กัมมี (Pye, 1997) โดยที่ค่าความแข็งแรง หมายถึง แรงที่ใช้ในการทำให้ตัวอย่างเกิดการเสียรูป ถ้าผลิตภัณฑ์มีค่าความแข็งแรงสูงแสดงว่าผลิตภัณฑ์มีความแข็งแรงของเจลมาก จึงต้องใช้แรงในการทำให้เกิดการเสียรูปมากด้วย ส่วนความยากในการเคี้ยวเป็นค่าที่บอกถึงพลังงานทั้งหมดที่ใช้ในการเคี้ยวบดอาหารก่อนกลืน โดยเมื่อปริมาณเจลลิตินเพิ่มขึ้นความแข็งแรงของเจลก็จะเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ต้องใช้พลังงานในการเคี้ยวบดอาหารเพิ่มมากขึ้น ค่าความยากในการเคี้ยวจึงมีแนวโน้มสูงขึ้น

จากการศึกษาผลของปริมาณเจลลิตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีการให้คะแนนความชอบ โดยใช้ hedonic scaling 9 points และใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน โดยกำหนดปัจจัยคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ซึ่งได้แก่ ความยืดหยุ่น ความแข็งแรง ความยากในการเคี้ยว และความชอบโดยรวม พบว่าปริมาณเจลลิติน และความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก มีผลต่อคะแนนความชอบของกัมมีเซลลูล์รอสตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4) ซึ่งกัมมีเซลลูล์รอสตะไคร้ที่มีปริมาณเจลลิตินร้อยละ 8 (T_3/T_4) มีค่าคะแนนความชอบด้านความยืดหยุ่น ความแข็งแรง ความยากในการเคี้ยว และความชอบโดยรวมสูงที่สุด คือ 7.47/7.70 7.23/7.53 7.50/7.87 และ 7.33/7.63 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ค่าคะแนนความชอบของกัมมีเซลล์รีสตะไคร้

สิ่งทดลอง	ปัจจัย		คะแนนความชอบ			
	เจลาติน (ร้อยละ)	ความเข้มข้นของกรดซิตริก (ร้อยละ)	ความยืดหยุ่น	ความแข็ง	ความยากในการเคี้ยว	ความชอบโดยรวม
1	7	30	6.00(0.64) ^d	6.20(0.96) ^c	5.87(1.25) ^c	6.13(0.90) ^b
2	7	50	6.47(0.90) ^c	6.50(1.33) ^c	6.13(1.54) ^c	6.37(1.30) ^b
3	8	30	7.47(0.68) ^a	7.23(0.97) ^a	7.50(0.73) ^a	7.33(0.92) ^a
4	8	50	7.70(0.60) ^a	7.53(0.68) ^{ab}	7.87(0.68) ^a	7.63(1.03) ^a
5	7.5	40	7.00(0.95) ^b	6.70(1.06) ^{bc}	6.80(1.32) ^b	6.50(1.41) ^b
6	7.5	40	6.97(0.76) ^b	6.70(0.95) ^{bc}	6.83(0.79) ^b	6.50(1.04) ^b
7	7.5	40	6.97(0.89) ^b	6.73(0.87) ^{bc}	6.87(0.82) ^b	6.50(1.11) ^b
8	7.5	40	7.00(0.95) ^b	6.67(0.61) ^c	6.80(0.85) ^b	6.57(0.68) ^b
9	7.5	40	7.00(0.95) ^b	6.73(0.98) ^b	6.83(0.97) ^b	6.53(0.86) ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95
ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล

เมื่อนำค่าคะแนนความชอบด้าน ความยืดหยุ่น ความแข็ง ความยากในการเคี้ยว และความชอบโดยรวมของกัมมีเซลล์รีสตะไคร้ มาวิเคราะห์ โดยวิธี RSM เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าคะแนนความชอบกับปริมาณเจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก พบว่า ความยืดหยุ่น ความแข็ง ความยากในการเคี้ยว และความชอบโดยรวม มีความสัมพันธ์กับปริมาณเจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกเพียงเล็กน้อย เห็นได้จากแบบจำลองคณิตศาสตร์มีค่า $R^2 < 0.7$ (ตารางที่ 5) จึงไม่นำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้มาสร้างกราฟ response surface ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าคะแนนความชอบของกัมมีเซลล์รีสตะไคร้

ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R ²	Model significance
ความยืดหยุ่น	$-3.8731 + 1.35x_1 + 0.0175x_2$	0.247	0.000
ความแข็ง	$-1.5722 + 1.0333x_1 + 0.015x_2$	0.126	0.000
ความยากในการเคี้ยว	$-6.425 + 1.6833x_1 + 0.0158x_2$	0.238	0.000
ความชอบโดยรวม	$-3.1093 + 1.2333x_1 + 0.0133x_2$	0.139	0.000

เมื่อพิจารณาผลของการทดสอบทางประสาทสัมผัสทั้งค่าคะแนนความเข้ม และค่าคะแนนความชอบแล้วจึงเลือกกัมมีเซลล์รีสตะไคร้ที่มีปริมาณเจลาตินร้อยละ 8 และความเข้มข้นของกรดซิตริก ร้อยละ 50 เป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป เนื่องจากมีความแข็งแรงของเจลและค่าคะแนนความชอบที่สูง

สรุป

การศึกษาผลของปริมาณเจลาติน และความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกที่มีต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกัมมี่เยลลีสตตะไคร้ พบว่า ปริมาณเจลาติน และความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก มีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าคะแนนความเข้มข้นของกัมมี่เยลลีสตตะไคร้ ด้านความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยว มีค่า $R^2 > 0.7$ และมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ซึ่งปริมาณเจลาตินมีผลต่อค่าคะแนนความเข้มข้น โดยเมื่อปริมาณเจลาตินเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยว เพิ่มขึ้น ส่วนความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกมีผลต่อค่าคะแนนความเข้มข้น โดยเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าความยืดหยุ่น ความแข็ง และความยากในการเคี้ยว มีการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ในขณะที่แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าคะแนนความชอบของกัมมี่เยลลีสตตะไคร้ มีค่า $R^2 < 0.7$ แสดงถึง ความสัมพันธ์ของปริมาณเจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกกับค่าคะแนนความชอบมีเพียงเล็กน้อย โดยค่าคะแนนความชอบในทุกด้านของกัมมี่เยลลีสตตะไคร้ที่มีปริมาณเจลาตินร้อยละ 8 และความเข้มข้นของกรดซิตริก ร้อยละ 50 มีคะแนนความชอบสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

- สุวรรณ สุภิมารส. (2543). เทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและช็อกโกแลต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Garcia, T. (2000). Analysis of Gelatin-Based Confections. *The Manufacturing Confectioner* 80 (6): 93-101.
- Lees, R. and E. B. Jackson. (1973). *Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture*. Leonard Hill Books. New York.
- Meilgaard, M., C. V. Civille and B. T. Carr. (1990). *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press, Inc., Florida, USA.
- Pye, J. (1997). *Gelatin and Applications*. In S. Maneepan, ed. *Symposium on Confectionery Technology*. Food Science and Technology Association of Thailand. Bangkok, Thailand. pp. 28-40.





ผลของการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้น ต่อนิเวศวิทยาในกระเพาะหมัก และการเจริญเติบโต ในโคนมสาว

Effects of Supplementation of Yeast Fermented Cassava Chip as a Replacement Concentrate on Rumen Ecology and Growth in Heifer

สิทธิศักดิ์ คำผา^{1*} สมมาศ อีฐรัตน์¹ อุทัย โคตรดก¹ กรุง วิชาชัย¹
ภูมิสิทธิ์ วรรณชารี¹ และ เมธา วรรณพัฒน์²

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ทดแทนอาหารชั้นต่อนิเวศวิทยาในกระเพาะหมักและการเจริญเติบโตในโคนมสาว การทดลองครั้งนี้ใช้โคนมสาว อายุ 1 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 200 ± 10 กิโลกรัม จำนวน 10 ตัว เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยประชากรสองกลุ่ม โดย ทรีทเมนต์ทดสอบได้แก่ ทรีทเมนต์ที่ 1 เสริมอาหารชั้นโปรตีน 14% ปริมาณ 1% น้ำหนักตัว และทรีทเมนต์ที่ 2 เสริมมันเส้นหมักยีสต์ ปริมาณร้อยละ 1 ของน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยประชากรทั้งสองกลุ่ม ด้วยวิธี T-test สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางข้าวหมักยูเรียร้อยละ 5 แบบกินเต็มที่ และถูกเลี้ยงขังในคอกเดี่ยว มีน้ำสะอาดให้กิน ตลอดเวลา ผลการทดลองพบว่า กลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้น มีผลต่อ สถานะความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนของของเหลวในกระเพาะหมักและยูเรียไนโตรเจน ในกระแสเลือดแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาณการกินได้อิสระไม่แตกต่างกัน ขณะที่อัตราการ เจริญเติบโตของโคนมสาวกลุ่มที่ได้รับการเสริมมันเส้นหมักยีสต์มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าในกลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริม อาหารชั้นโปรตีน 14% (385 และ 351 กรัม/วัน) และสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ของราและประชากรของ แบคทีเรียในกระเพาะหมัก ส่งผลให้ประชากรของโปรโตซัวลดลงแตกต่างกันทางสถิติ สามารถ สรุปได้ว่า มันเส้นหมักยีสต์สามารถทดแทนอาหารชั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมักในกระเพาะหมัก ตลอดจนเพิ่มการเจริญเติบโตในโคนมสาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 44000

² ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

* Corresponding Author, E-mail: sittisak_k2003@yahoo.com

Abstract

The objective of this study was to determine the influence of supplementation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fermenting cassava chip as a replacement for concentrate on rumen ecology and growth in heifer. Ten, one year old of dairy heifers with initial body weight of 200 ± 10 kg were randomly divided into two groups and received concentrate at 14 %CP (1% BW) + *ad libitum* 5% urea-treated rice straw as the roughage (T1); yeast fermented cassava chip (YFCC) at 1 %BW + *ad libitum* 5% urea-treated rice straw as the roughage (T2). Means were compared using T-test. All animals were kept in individual pen and received free access to water. The results have revealed that the replacement of YFCC was significantly affected ruminal pH, ammonia-nitrogen and blood urea nitrogen concentration in heifers. However, feed intake was not significantly different, while average daily gain (ADG) was higher in heifers fed YFCC (T2) treatment than those heifers fed 14 %CP concentrates (T1) (385 and 351 g/d, respectively). In addition, supplementation of YFCC (T2) could improve population of bacteria and fungal zoospore. Furthermore, *Holotrich* and *Entodiniomorph* protozoa populations were decreased significantly. The results indicate that supplementation of yeast fermented cassava chip as a replacement for 14 %CP concentrate could improve rumen fermentation efficiency and growth in heifers.

คำสำคัญ : มันเส้น ยีสต์ อาหารข้น นิเวศวิทยาในกระเพาะหมัก โคนมสาว

Keywords : Cassava chip, *Saccharomyces cerevisiae*, Concentrate, Rumen ecology, Heifer

บทนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกพืชเศรษฐกิจหลัก เช่น ปลูกข้าว ข้าวโพด และมันสำปะหลัง และอื่นๆ เพื่อเป็นอาชีพหลัก รอง สำหรับด้านการผลิตปศุสัตว์ที่สำคัญ ได้แก่ การเลี้ยงโคเนื้อ-โคนม และกระบือ ที่มีอยู่มากมาย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีความเหมาะสมทั้งแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เพียงพอ ง่ายต่อการเลี้ยงดู ปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ได้ประสบวิกฤตด้านวัตถุดิบอาหารสัตว์ราคาแพง ซึ่งส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตสัตว์ตลอดจนผู้บริโภคเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ ที่ผ่านมามีการศึกษาวิจัยมากมายถึงแนวทางการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ท้องถิ่นเพื่อเพิ่มมูลค่า และลดต้นทุนการผลิต เช่น มันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกมากมายในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทุกภูมิภาค ตลอดจนและเป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งหัวและใบเพื่อเป็นอาหารสัตว์

ทั้งเป็นแหล่งของโปรตีนและพลังงาน ตลอดจนช่วยในการกำจัดพยาธิในระบบทางเดินอาหาร (Wanapat, 2003) จากการศึกษาโดย กฤษฎา บุญนพ (2551) รายงานว่า มันสำปะหลังหมักยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนกากถั่วเหลืองในอาหารข้นสำหรับโคเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการรายงานโดย Khampa et al. (2006) พบว่าการเสริมสารมาเลทในอาหารข้นที่มีมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบในระดับสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมักและการสังเคราะห์จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักในโคนม และช่วยลดต้นทุนด้านอาหาร ซึ่งการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์ท้องถิ่นจะเป็นแนวทางที่สำคัญที่จะนำไปสู่การลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งเป็นแนวทางการพัฒนาประเทศต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้โคนมสาว อายุ 1 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 200+10 กิโลกรัม จำนวน 10 ตัว หลังจากนั้นทำการ ฉีดวิตามินเอ ดี 3 และอี พร้อมทั้งฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยและโรคคอบวมให้สัตว์ทุกตัวก่อนเข้าการทดลอง

แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบประชากรสองกลุ่มที่อิสระต่อกัน โดยสุ่มสัตว์ทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มมีจำนวน 2 ตัวต่อกลุ่ม ซึ่งมีทรีทเมนต์ที่ทดสอบดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1: เสริมอาหารข้นโปรตีน 14%

ทรีทเมนต์ที่ 2: เสริมมันเส้นหมักยีสต์

Saccharomyces cerevisiae

หมายเหตุ: สัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่มได้รับทรีทเมนต์ ปริมาณ 1% ของน้ำหนักตัว ร่วมกับฟางข้าวหมักยูเรีย 5% เป็นแหล่งอาหารหยาบกินเต็มที่ (ad libitum)

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. ให้สัตว์แต่ละตัวขังในคอกเดี่ยวและได้รับการเสริมแร่ธาตุก่อนเพื่อป้องกันการขาดแร่ธาตุด้วยวิธีการให้สัตว์ได้เลียแบบอิสระ

2. มีน้ำสะอาดให้โคกินตลอดเวลา

3. สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับอาหารตามทรีทเมนต์ที่กำหนดเป็นระยะเวลา 120 วัน

กระบวนการผลิตมันสำปะหลังหมักยีสต์

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผสม 20 กรัม; น้ำตาลทราย 20 กรัม และน้ำ 100 มิลลิลิตร ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 ผสมกากน้ำตาล 24 กรัม; ยูเรีย 48 กรัม และน้ำ 100 มิลลิลิตร ให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ประมาณ 10 ซีซี. เพื่อปรับ pH ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 3.5 - 3.8 ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 เลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว โดย

นำยีสต์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาเทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 2 และใช้เครื่องปั๊มออกซิเจนเป็นเวลา 60 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 ผสมน้ำหมักยีสต์ ร่วมกับมันสำปะหลัง เมื่อครบ 60 ชั่วโมง โดยนำของเหลว น้ำหมักยีสต์มาผสมกับมันสำปะหลังแห้งในสัดส่วนมันเส้น 1 กิโลกรัม ต่อน้ำหมักยีสต์ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและหมักใส่ถุงพลาสติกปิดถุงให้แน่นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 5 ผลัดถังหมักมันสำปะหลังหมักยีสต์ โดยนำมันเส้นหมักยีสต์มาตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน และนำไปให้สัตว์กินต่อไป

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของมันเส้นหมักยีสต์และอาหารหยาบ ได้แก่ วัตถุแห้ง อินทรีย์วัตถุ ไชมัน โปรตีนหยาบ ตามวิธีของ AOAC (1990) และเยื่อใยได้แก่ neutral detergent fiber (NDF), acid-detergent fiber (ADF) ตามวิธีการของ Van Soest (1994)

การเก็บข้อมูลและสุ่มเก็บตัวอย่าง

1. บันทึกปริมาณการกินได้อิสระของอาหารข้นและอาหารหยาบ ทำการบันทึกปริมาณการให้อาหารหยาบทุกครั้งที่ใช้ โดยชั่งน้ำหนักก่อนให้และอาหารหยาบที่เหลือจะชั่งออกในตอนเช้าของวันถัดไป ก่อนให้อาหารตอนเช้าและคำนวณปริมาณการกินได้ของวัตถุแห้งในแต่ละวัน

2. เก็บตัวอย่างเลือด ที่เวลา 0 2 และ 4 ชั่วโมงหลังการให้อาหารในวันที่ 1 15 30 60 90 และวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งสุ่มเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเก็บส่วน plasma เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียไนโตรเจนในเลือด (blood urea nitrogen; BUN)

3. ทำการชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลอง โดยชั่งน้ำหนักในวันแรกของการทดลอง และทุก 30 วันของการทดลองเพื่อคำนวณหาปริมาณการกินได้

4. เก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) ของสัตว์ทดลองทุกตัวที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมงหลังการให้อาหารในวันที่ 1 30 60 90 และ วันสุดท้ายของการทดลอง โดยวิธีการใช้ stomach tube ร่วมกับ vacuum pump แล้วแบ่ง rumen fluid เป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่หนึ่ง ประมาณ 100 มิลลิลิตร นำมา วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (Orion Research Model SA 230) จากนั้นนำ rumen fluid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มาปรับให้มี pH ประมาณ 2 ด้วยการเติม 1M ของกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ในสัดส่วน 1M H_2SO_4 ต่อของเหลวจากกระเพาะหมัก คือ 1:20 เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer

ส่วนที่สอง นำ rumen fluid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่บรรจุ 10% formaline ใน น้ำเกลือที่มี methyl green ในปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าขวดเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปปั่นภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการนับตรง เพื่อวิเคราะห์หา จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และรา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบประชากรสองกลุ่มโดย Proc TTEST (SAS, 1998)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ส่วนประกอบทางโภชนาการในอาหาร

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้อาหารข้นที่ทำการผสมสูตรเอง โดยมีมันสำปะหลัง (มันเส้น) เป็นแหล่งพลังงานหลักร่วมกับการใช้แหล่งวัตถุดิบอื่นๆ ซึ่งมี โปรตีนในระดับร้อยละ 14.2 การทดลองใช้ยูเรียที่ระดับ

ร้อยละ 2 ดังแสดงในตารางที่ 1 ร่วมกับแหล่งวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีอยู่ภายในท้องถิ่นและสามารถหาได้ง่าย นอกจากนี้ในส่วนของมันเส้น เกษตรกรสามารถเพาะปลูกได้เอง และเตรียมมันสำปะหลังได้เองภายในฟาร์มด้วย

ฟางข้าวหมักยูเรียร้อยละ 5 มีคุณค่าทางโภชนาการ ดังนี้ วัตถุดิบ อินทรีย์วัตถุ โปรตีนหยาบ NDF ADF โภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด (TDN) เถ้า และพลังงาน (ME) มีค่าเท่ากับร้อยละ 51.1 87.1 7.3 71.1 54.3 54.7 12.9 และ 2.0 เมกะแคลอรี/กิโลกรัม (Mcal/kg) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโภชนาการในอาหารที่ใช้ในการทดลองพบว่า อาหารข้นมีค่าเฉลี่ยของวัตถุดิบ อินทรีย์วัตถุ โปรตีนหยาบ NDF ADF โภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด (TDN) เถ้า และพลังงานมีค่าเท่ากับร้อยละ 91.5 90.3 14.2 25.7 14.6 78.3 9.7 และ 3.1 Mcal/kg ตามลำดับ

นอกจากนี้ พบว่ามันเส้นหมักยีสต์มีปริมาณโภชนาการต่างๆ คือ ค่าเฉลี่ยของวัตถุดิบ อินทรีย์วัตถุ โปรตีนหยาบ NDF ADF TDN เถ้าและพลังงานมีค่าเท่ากับร้อยละ 89.1 89.5 27.3 17.2 6.1 78.9 10.5 และ 3.3 Mcal/kg ตามลำดับ ซึ่งปริมาณโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้นในมันเส้นหมักยีสต์น่าจะมาจากเซลล์จุลินทรีย์ (single cell protein, SCP) ในที่นี้มาจากเอนโดสปอร์ของ *S. cerevisiae* ดังรายงานของ Oboh and Elusiyan (2007) รายงานเอนโดสปอร์ที่ว่า การหมักมันสำปะหลังโดยใช้เปลือกมัน สำปะหลังหมักร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถเพิ่มโปรตีนหยาบในเปลือกมัน สำปะหลังได้ถึง 21.5% และมันสำปะหลังที่มีระดับกรดไขมันอิสระต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อหมักร่วมกับ *R. oryzae* และ *S. Cerevisiae* สามารถเพิ่มโปรตีนจาก 8.8 เป็น 10.5 และ 9.6 เป็น 12.6% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารชั้น (% as fed) วัดดูดิบ

วัตถุดิบ	เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหารชั้น
มันสำปะหลัง	65
รำอ่อน	6
กากปาล์ม	10
กากเบียร์แห้ง	10
ยูเรีย	2
กากน้ำตาล	5
กำมะถันบด	0.5
เกลือ	0.5
แร่ธาตุพรีมิกซ์	1
รวม	100

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารชั้นมันเส้นหมักยีสต์และฟางข้าวหมักยูเรียร้อยละ 5

องค์ประกอบทางเคมี (% DM)	อาหารชั้น	มันเส้นหมักยีสต์	ฟางข้าวหมักยูเรีย
วัตถุแห้ง	91.5	89.1	51.1
อินทรีย์วัตถุ	90.3	89.5	87.1
โปรตีนหยาบ	14.2	17.2	7.3
โภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด (TDN) ¹	78.3	78.9	54.7
เถา	9.7	10.5	12.9
เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง	25.7	17.5	71.1
เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด	14.6	6.1	54.3
พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ (ME; Mcal/kg)	3.1	3.3	2.0
ราคา (บาท/กก.)	7.8	7.5	2.1

¹TDN = dig CP + dig CF + dig EE x 2.25 + dig NFE (NRC, 1989).

ปริมาณการกินได้อิสระ อัตราการเจริญเติบโต และต้นทุนการผลิต

ปริมาณการกินได้อิสระของฟางข้าวหมักยูเรีย และปริมาณการกินได้ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมมันเส้นหมักยีสต์มีแนวโน้มปริมาณการกินได้อิสระที่สูงกว่ากลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมอาหารชั้นโปรตีน 14% ตลอดจนการเจริญเติบโตและต้นทุนค่าอาหารทั้งหมด

แตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกลุ่มโคนมสาวที่ได้รับมันเส้นหมักยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงกลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมอาหารชั้นโปรตีน 14% ด้วยค่าเฉลี่ย 385 และ 351 กรัม/วัน และต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวของสัตว์เฉลี่ย 92 และ 98 บาท/กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของการกินได้อิสระ เนื่องมาจากยีสต์ไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของราและแบคทีเรีย

เป็นการใช้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้ของอาหารที่สัตว์ได้รับ ส่งผลให้ปริมาณการกินได้ของอาหารเพิ่มขึ้น และส่งผลให้ความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะ และปริมาณการกินได้เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3 ผลของการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้นโปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณการกินได้อิสระ และอัตราการเจริญเติบโตในโคนมสาว

ปริมาณการกินได้อิสระ	T1	T2	P-value
ร้อยละของน้ำหนักตัว			
อาหารชั้น	1.0	-	-
มันเส้นหมักยีสต์	-	1.0	-
ฟางข้าวหมักยูเรีย	1.6	1.7	0.0841 ^{NS}
การกินได้ทั้งหมด	2.6	2.7	0.0982 ^{NS}
อัตราการเจริญเติบโต (กรัม/วัน)	351	385	0.0352*
ต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวของสัตว์ (บาท/กิโลกรัม)	98	92	0.0426*

T1 = เสริมอาหารชั้น โปรตีนร้อยละ 14
T2 = เสริมมันเส้นหมักยีสต์
NS = Non significant ($P>0.05$; * = Significant ($P<0.05$))

สภาวะความเป็นกรด-ด่างของเหลวในกระเพาะหมัก

ค่าความเป็นกรด-ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะหมัก ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยค่า pH ของของเหลวในกระเพาะหมักครั้งนี้อยู่ในช่วง 6.7-6.9 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่ออนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องเขตร้อนเป็นผลดีต่อจุลินทรีย์ในการปรับตัวกับสภาพภายในกระเพาะหมัก (เมธา อรรถพัฒน์, 2533) โดยทำให้การสังเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้และการสังเคราะห์จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ในสภาวะที่สัตว์ได้รับอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายได้ง่ายในระดับสูงจะส่งผลให้เกิดกรดแลคติกเพิ่มขึ้น และ pH ต่ำภายในกระเพาะหมัก ซึ่งจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ไม่สามารถดำรงชีพและส่งผลให้ประชากรของจุลินทรีย์ลดลงอย่างรวดเร็ว การเสริมยีสต์จะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการใช้ประโยชน์จากเมล็ดแป้งโดยโปรโตซัวและแบคทีเรียที่ย่อยสลายแป้ง

ความเข้มข้นของแอมโมเนียในโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ในกระเพาะหมัก

ระดับแอมโมเนียในโตรเจนภายในกระเพาะหมักมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่า ในกลุ่มโคนมสาวที่ได้รับมันเส้นหมักยีสต์ มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมอาหารชั้นโปรตีน 14% (ร้อยละ 20.3 และ 17.5 มิลลิกรัม) ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งเป็นผลจากปริมาณการกินได้ของอาหารชั้นที่ได้รับในสูตรอาหารที่มีมันเส้นหมักยีสต์สามารถกระตุ้นปริมาณการกินได้อิสระของฟางข้าวหมักยูเรียและปริมาณการกินได้จากอาหารทั้งหมดเพิ่มขึ้น ส่งผลโดยตรงต่อประชากรของแบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์ กรดอะมิโน และให้ได้เป็นผลผลิตสุดท้ายคือ แอมโมเนียที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งยูเรียสามารถเป็นแหล่งแอมโมเนียในโตรเจนที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก เป็นการนำแอมโมเนียในโตรเจนไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนร่วมกับกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายของคาร์โบไฮเดรตที่ถูกหมักได้อย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 4 ผลของการเสริมมันเส้นหมกยีสต์ทดแทนอาหารชั้นโปรตีน 14% ต่อนิวเคลียสในกระเพาะหมักในโคนมสาว

นิวเคลียสภายในกระเพาะหมัก	T1	T2	P-value
ความเป็นกรด-ด่าง	6.7	6.9	0.0442*
ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมัก (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)	17.5	20.3	0.0356*
ความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)	10.4	13.2	0.0462*
ประชากรจุลินทรีย์ (เซลล์/มล.)			
แบคทีเรีย ($\times 10^{11}$)	6.3	8.7	0.0354*
โปรโตซัว			
<i>Holotric</i> ($\times 10^3$)	5.3	3.9	0.0351*
<i>Entodiniomorph</i> ($\times 10^5$)	6.2	4.1	0.0425*
ซูโอสปอร์ของรา ($\times 10^6$)	7.3	9.8	0.0424*

T1= เสริมอาหารชั้นโปรตีน 14%
T2 = เสริมมันเส้นหมกยีสต์
* = Significant ($P<0.05$)

(Church, 1979) โดยปัจจัยที่มีผลต่อระดับของแอมโมเนียไนโตรเจนเพิ่มขึ้นนั้นมาจากความหลากหลายของสูตรอาหารต่อการใช้ประโยชน์จาก โปรตีนและความสัมพันธ์ของเซลล์ยีสต์มีชีวิตต่อนิวเคลียส ตลอดจนความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนในของเหลวในกระเพาะหมักมีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อนิวเคลียสของจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในกระเพาะหมักสอดคล้องกับ Wanapat and Pimpa (1999) รายงานว่าในสภาพนิวเคลียสภายในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องในเขตร้อนระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนที่เหมาะสมมีค่าอยู่ระหว่าง 15-30 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เนื่องจากยูเรียสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ซึ่งให้ผลผลิตสุดท้ายคือแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น และสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์

ความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด

จากผลการทดลองตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของระดับยูเรียไนโตรเจน (blood urea nitrogen; BUN) ในกระแสเลือดแตกต่างกันทางสถิติ กลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมมันเส้นหมกยีสต์มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มโคที่ได้รับการเสริมอาหารชั้นโปรตีน 14% (13.2% และ 10.4 มิลลิกรัม) โดยความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดมีค่าอยู่ในช่วงปกติซึ่งระดับของความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดของโคเนื้อและกระบือปกติจะอยู่ในช่วงร้อยละ 6.3-25.5 มิลลิกรัม ซึ่งค่าความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการที่เกิดการหมักย่อยของโปรตีนได้เป็นแอมโมเนียไนโตรเจนและถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะหมักเข้าสู่กระแสเลือด ก่อนที่จะถูกนำไปเปลี่ยนเป็นยูเรียโดยผ่านวัฏจักรยูเรียที่ตับซึ่งแอมโมเนียมากกว่า 80% จะถูกจุลินทรีย์นำไปสังเคราะห์โปรตีน ส่งผลให้ความเข้มข้นของยูเรีย

ไนโตรเจนในกระแสดูดต่ำลงไปด้วย ทั้งนี้เพราะแอมโมเนียสามารถถูกจุลินทรีย์นำไปสังเคราะห์โปรตีนมากกว่าที่ดูดซึมผ่านผนังกระเพาะหมักเข้าสู่กระแสดูด และถูกนำไปเปลี่ยนเป็นยูเรียโดยผ่านวัฏจักรยูเรียที่ดับอีกครั้ง หากประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนในกระเพาะหมักเป็นไปอย่างเหมาะสมและความเข้มข้นของยูเรียในโตรเจนจะใกล้เคียงกับความเข้มข้นของแอมโมเนียในโตรเจน แต่หากพบว่าความเข้มข้นของยูเรียในโตรเจนสูงกว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียในโตรเจนมาก อาจบ่งชี้ได้ว่า การใช้ไนโตรเจนในกระเพาะหมักมีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้แอมโมเนียในโตรเจนในกระเพาะหมักถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะหมักเข้าสู่กระแสดูดจำนวนมาก ซึ่งเป็นการสูญเสียไนโตรเจนจากอาหารทางหนึ่ง จากการศึกษารุ่นนี้พบว่า ความเข้มข้นของยูเรียในโตรเจนในกระแสดูดมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียในโตรเจนในกระเพาะหมัก แสดงว่า กระบวนการนำใช้ในโตรเจนในกระเพาะหมักเป็นไปอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

จำนวนแบคทีเรีย โปรโตซัว และซูโอสปอร์ของรา

จากการตรวจนับประชากรของจุลินทรีย์ในของเหลวในกระเพาะหมักหลังการให้อาหารทดสอบโดยวิธีการนับตรง พบว่า จำนวนแบคทีเรียและราในกระเพาะหมักมีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4) ในกลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมมันเส้นหมักยีสต์ มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มโคนมสาวที่ได้รับการเสริมอาหารชั้นโปรตีน 14% โดยประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.6 และ 7.3×10^{11} เซลล์/มิลลิลิตร และซูโอสปอร์ของรามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.7 และ 6.1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยการเสริมเซลล์ยีสต์มีชีวิตในสูตรอาหารชั้นที่มีแหล่งพลังงานหลักมาจากคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายได้ง่าย และได้รับอาหารชั้นในระดับที่สูงสามารถลดจำนวนประชากรโปรโตซัว Entodiniidae และ Holotrichidae ซึ่งโปรโตซัวกลุ่ม

Entodiniomorph จะชอบกินอาหารพวกแป้งได้มากกว่า โดยการกลืนกินเม็ดแป้งและกลูโคสเพื่อเก็บสะสมในรูปของโพลีแซคคาไรด์ในเซลล์ของโปรโตซัวจะช่วยชะลอไม่ให้แป้งถูกหมักอย่างรวดเร็ว โดยแบคทีเรียสามารถลดการเกิดกรดในปริมาณมาก และสามารถรักษาสภาพภายในกระเพาะหมักได้อย่างเหมาะสม ซึ่งยีสต์จะไปช่วยย่อยน้ำตาล และโพลิแซคคาไรด์ได้ ผลผลิตเป็น เอทานอล กลีเซอรอล เปปไทด์ และกรดอะมิโนที่ีจะเป็นแหล่งอาหารสำหรับแบคทีเรียต่อไป นอกจากนี้ยีสต์ยังทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน ดังนั้น การเสริมยีสต์จะช่วยทำให้ออกซิเจนที่ติดมากับอนุภาคของอาหารถูกใช้ประโยชน์ส่วนแบคทีเรียในกระเพาะหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจนก็จะเข้าเกาะติดกับอนุภาคอาหารได้ดีขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า การเสริมมันเส้นหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้นโปรตีน 14% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพนิเวศวิทยาในกระเพาะหมักและเพิ่มการเจริญเติบโตในโคนมสาว นอกจากนี้ ยังเป็นแนวทางในการพัฒนาและเพิ่มคุณค่าทางโภชนาของมันสำปะหลัง (มันเส้น) เพื่อเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน (TROFREC) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ จึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา บุญพ. (2551). การศึกษากระบวนการผลิตและการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากมันสำปะหลังหมักยีสต์ต่อกระบวนการหมัก

- การสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีน และความ
สามารถในการย่อยได้ของโภชนะในสัตว์เคี้ยว-
เอื้อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร-
มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น
เมธา วรรณพัฒน์. (2533). โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง.
หจก.ฟีนีเพล็กซ์ซิ่ง, กรุงเทพมหานคร.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th
edn. Association of Official Analytical
Chemists, Virginia.
- Church, D.C. (1979). Digestive Physiology and
Nutrition of Ruminants. Vol. I. O&B Books
Inc. Corvallis, Oregon, USA.
- Khampa, S., Wanapat, M., Wachirapakorn, C.,
Nontaso, N. and Wattiaux, M. (2006).
Effect of levels of sodium dl-malate supple-
mentation on ruminal fermentation efficiency
in concentrates containing high levels of
cassava chip in dairy steers. Asian-
Australasian Journal of Animal Science. 19
: 368-375.
- Oboh, G. and Elusiyan, C.A. (2007). Changes in the
nutrient and anti-nutrient content of micro-
fungi fermented cassava flour produced from
low and medium-cyanide variety of cassava
tubers. Africa Journal Bilotechnology. 6:
2150-2155.
- NRC. (1989). Nutritional Requirements of Dairy
Cattle. Washington, DC: National Academy
Press, pp. 113-114.
- SAS. (1998). User's Guide: Statistic, Version 5.
Edition. SAS. Inst Cary, NC., USA.
- Van Soest, P.J. (1994). Nutritional Ecology of the
Ruminant, second ed. Ithac, NY. USA:
Cornell University Press.
- Wanapat, M. (2003). Manipulation of cassava culti-
vation and utilization to improve protein to
energy biomass for livestock feeding in the
tropics. Asian-Australasian Journal of
Animal Science. 16: 463-472.
- Wanapat, M. and Pimpa, O. (1999). Effects of
ruminal NH₃-N levels on ruminal fermen-
tation, purine derivatives, digestibility and
rice straw intake in swamp buffaloes. Asian-
Australasian Journal of Animal Science. 12:
904-907.



Fixed Point Theorems and Convergence for Mean Nonexpansive Mappings

Sukanya Somprom¹ Satit Saejung^{1*}

Abstract

Let C be a subset of a Banach space X . A mapping $T: C \rightarrow C$ is mean nonexpansive if there are nonnegative real numbers a and b such that $a + b \leq 1$ and the inequality $\|Tx - Ty\| \leq a\|x - y\| + b\|x - Ty\|$ holds for all $x, y \in C$. In Hilbert space setting, we prove a fixed point theorem for mean nonexpansive mappings and some convergence results for any orbit $\{T^n x\}$ where $x \in C$.

Keywords: mean nonexpansive mapping; Hilbert space, weak and strong convergence

1 Introduction

Let C be a subset of a Banach space X . For nonnegative real numbers a and b such that $a + b \leq 1$, a mapping $T: C \rightarrow C$ is said to be (a, b) -mean nonexpansive if

$$\|Tx - Ty\| \leq a\|x - y\| + b\|x - Ty\| \quad \text{for all } x, y \in C.$$

We also say that T is mean nonexpansive if T is (a, b) -mean nonexpansive for some nonnegative real numbers a and b such that $a + b \leq 1$. This type of mappings is introduced in (Zhang, 1975) and extensively studied in (Wu and Zhang, 2007) and (Yang and Cui, 2008). Since many results of this mapping in Hilbert space setting have not been investigated, the purpose of this paper is to present such results.

We note here that if $T: C \rightarrow C$ is mean nonexpansive and $F(T) := \{x \in C : x = Tx\} \neq \emptyset$, then T is quasi-nonexpansive. Recall that $T: C \rightarrow C$ is quasi-nonexpansive if $F(T) \neq \emptyset$ and $\|Tx - p\| \leq \|x - p\|$ for all $x \in C$ and $p \in F(T)$.

2 Results

We start with an easy observation which is used many times in the paper. We assume that the readers are familiar with the terms and definitions given in any standard text on functional analysis (e.g., see [2]).

Proposition 1 Let C be a subset of a Banach space X and $T: C \rightarrow C$ be a quasi-nonexpansive mapping, then $\{T^n x\}$ is bounded for all $x \in C$.

Proof. Let $p \in F(T)$. Then $\|T^n x - p\| \leq \|x - p\|$ for all $n \in \mathbb{N}$ and hence the result is proved. $\square$

The following proposition seems to be known but apparently no mention of it has been made in the literature.

Proposition 2 Let C be a nonempty closed convex subset of a Hilbert space H . Suppose that $T: C \rightarrow C$ is a

¹ Department of Mathematics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding Author, E-mail: saejung@kku.ac.th

quasi-nonexpansive mapping. Then $F(T)$ is closed and convex.

Proof. We prove that $F(T)$ is closed. Let $\{x_n\}$ be a sequence in $F(T)$ such that $x_n \rightarrow x_0$. Then $\|Tx_0 - x_n\| \leq \|x_0 - x_n\| \rightarrow 0$ and hence $x_n \rightarrow Tx_0$. This implies that $x_0 \in F(T)$. Finally we show that $F(T)$ is convex. Let $x, y \in F(T)$ and $t \in [0, 1]$. We write $z = (1-t)x + ty$. By the Generalized Parallelogram Law, we have

$$\begin{aligned} \|z - Tz\|^2 &= \|(1-t)x + ty - Tz\|^2 \\ &= \|(1-t)(x - Tz) + t(y - Tz)\|^2 \\ &= (1-t)\|x - Tz\|^2 + t\|y - Tz\|^2 - (1-t)t\|(x - Tz) - (y - Tz)\|^2 \\ &\leq (1-t)\|x - z\|^2 + t\|y - z\|^2 - (1-t)t\|x - y\|^2 \\ &= (1-t)t^2\|x - y\|^2 + (1-t)^2t\|x - y\|^2 - (1-t)t\|x - y\|^2 = 0. \end{aligned}$$

This implies that $z \in F(T)$ as required. $\square$

We first prove the following fixed point theorem.

Theorem 3 Let C be a nonempty closed convex subset of a Hilbert space H . Suppose that $T: C \rightarrow C$ is an (a, b) -mean nonexpansive mapping with $a > 0$, $b \geq 0$ and $a + b \leq 1$. Then the following are equivalent:

- (1) $F(T) \neq \emptyset$;
- (2) For each $x \in C$, the sequence $\{T^n x\}$ is bounded;
- (3) There exists $x \in C$ such that the sequence $\{T^n x\}$ is bounded.

Proof. (1) $\Rightarrow$ (2) It follows from Proposition 1.

(2) $\Rightarrow$ (3) is obvious.

(3) $\Rightarrow$ (1) Suppose that the sequence $\{T^n x\}$ is bounded for some $x \in C$. For $y \in C$ and any nonnegative integer k ,

$$\begin{aligned} \|T^{k+1}x - Ty\|^2 &\leq (a\|T^k x - y\| + b\|T^k x - Ty\|)^2 \\ &\leq a\|T^k x - y\|^2 + b\|T^k x - Ty\|^2 \\ &= a\|(T^k x - Ty) + (Ty - y)\|^2 + b\|T^k x - Ty\|^2 \\ &= a(\|T^k x - Ty\|^2 + 2\langle T^k x - Ty, Ty - y \rangle + \|Ty - y\|^2) + b\|T^k x - Ty\|^2 \\ &\leq \|T^k x - Ty\|^2 + 2a\langle T^k x - Ty, Ty - y \rangle + a\|Ty - y\|^2. \end{aligned}$$

Then

$$\|T^{k+1}x - Ty\|^2 - \|T^k x - Ty\|^2 \leq 2a\langle T^k x - Ty, Ty - y \rangle + a\|Ty - y\|^2.$$

Hence

$$\frac{1}{n}(\|T^n x - Ty\|^2 - \|x - Ty\|^2) \leq 2a\langle S_n x - Ty, Ty - y \rangle + a\|Ty - y\|^2,$$

where

$$S_n x = \frac{1}{n} \sum_{k=0}^{n-1} T^k x.$$

It follows from the boundedness of $\{T^n x\}$ that $\frac{1}{n}(\|T^n x - Ty\|^2 - \|x - Ty\|^2) \rightarrow 0$ and there is a subsequence $\{S_{n_k} x\}$ of the bounded sequence $\{S_n x\}$ such that $\{S_{n_k} x\}$ converges weakly to some $p \in C$. This implies that

$$0 \leq 2a\langle p - Ty, Ty - y \rangle + a\|Ty - y\|^2.$$

Letting $y = p$ gives $0 \leq -a\|Tp - p\|^2$ and hence $p = Tp$ provided that $a > 0$. This completes the proof. $\square$

Based on Proposition 2, we have the following result which is a generalization of Lemma 3.2.2 of Takahashi (2000).

Theorem 4 Let C be a closed convex subset of a Hilbert space H and $T: C \rightarrow C$ a quasi-nonexpansive mapping. Suppose

that P is a metric projection of H onto $F(T)$. Then, for each $x \in C$, the sequence $\{PT^n x\}$ converges strongly to an element in $F(T)$.

Proof. Let $x \in C$ and $n \in \mathbb{N}$. It follows from $PT^n x \in F(T)$ and the quasi-nonexpansiveness of T that

$$\|PT^{n+1}x - T^{n+1}x\| \leq \|PT^n x - T^{n+1}x\| \leq \|PT^n x - T^n x\|.$$

Then the sequence $\{\|PT^n x - T^n x\|\}$ is nonincreasing and hence $a = \lim_{n \rightarrow \infty} \|PT^n x - T^n x\|$ exists. We finally prove that $\{PT^n x\}$ is a Cauchy sequence in $F(T)$. To see this, let $k \in \mathbb{N}$ and consider the following

$$\begin{aligned} \|PT^{n+k}x - PT^n x\|^2 &\leq \|T^{n+k}x - PT^n x\|^2 - \|PT^{n+k}x - T^{n+k}x\|^2 \\ &\leq \|T^n x - PT^n x\|^2 - \|PT^{n+k}x - T^{n+k}x\|^2. \end{aligned}$$

Hence the result is proved since $F(T)$ is closed. $\square$

We now prove Baillon's type nonlinear ergodic theorem for mean nonexpansive mappings.

Theorem 5 (Baillon's type nonlinear ergodic theorem) Let C be a closed convex subset of a Hilbert space H . Suppose that $T: C \rightarrow C$ is an (a, b) -nonexpansive mapping with $a > 0$, $b \geq 0$ and $a + b \leq 1$. If $F(T) \neq \emptyset$, then for each $x \in C$, the sequence $\{S_n x = \frac{1}{n} \sum_{k=0}^{n-1} T^k x\}$ converges weakly to some point in C . In this case, we can define $Q: C \rightarrow F(T)$ by

$$Qx = w - \lim_{n \rightarrow \infty} S_n x \quad \text{for all } x \in C.$$

Moreover,

- (1) Q is onto;
- (2) $QT^n = T^n Q = Q$ for all positive integer n and

$$Qx \in \overline{CO}\{T^n x: n = 0, 1, 2, \dots\};$$
- (3) $Q^2 = Q$ and Q is quasi-nonexpansive.

Proof. (1) We first show that the mapping Q is well-defined. Let P be a metric projection from H onto $F(T)$. For $x \in C$, we have $PT^n x \rightarrow p \in F(T)$. Since $\{S_n x\}$ is bounded, there exists a weakly convergent subsequence $\{S_{n_i} x\}$ of $\{S_n x\}$. Suppose that $S_{n_i} x \xrightarrow{w} q$. We prove that $q = p$ by showing that $\langle u - p, q - p \rangle \leq 0$ for all $u \in F(T)$. Let $u \in F(T)$ and $i \in \mathbb{N}$. Then

$$\langle (u - p) - (PT^i x - p), T^i x - PT^i x \rangle = \langle u - PT^i x, T^i x - PT^i x \rangle \leq 0$$

and hence

$$\begin{aligned} \langle u - p, T^i x - PT^i x \rangle &\leq \langle PT^i x - p, T^i x - PT^i x \rangle \\ &\leq \|PT^i x - p\| \|T^i x - PT^i x\| \\ &\leq \|PT^i x - p\| \|x - Px\|. \end{aligned}$$

This means

$$\begin{aligned} \left\langle u - p, S_n x - \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} PT^i x \right\rangle &= \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} \langle u - p, T^i x - PT^i x \rangle \\ &\leq \|x - Px\| \sum_{i=0}^{n-1} \frac{\|PT^i x - p\|}{n}. \end{aligned}$$

It follows from $S_{n_i} x \xrightarrow{w} q$ and $PT^{n_i} x \rightarrow p$ that

$$\langle u - p, q - p \rangle \leq 0.$$

Moreover, it can be proved that $q \in F(T)$ and hence $q = p$. By the double extract subsequence principle, we have $S_n x \xrightarrow{w} p \in F(T)$ and Q is well-defined. It is also obvious that Q is onto.

(2) It is obvious that $TQ = Q$ and $Qx \in \overline{CO}\{T^n x: n = 0, 1, 2, \dots\}$. To see that $QT = Q$, we let $x \in C$. Then, since

$\{T^n x\}$ is bounded,

$$S_n T x - S_n x = \frac{1}{n} (T^n x - x) \rightarrow 0.$$

Therefore, the conclusion follows by induction.

(3) We observe first that $F(T) = F(Q)$. Let $x \in C$ and $p \in F(T)$. Then, for each $n \in \mathbb{N}$,

$$\langle S_n x - p, Qx - p \rangle \leq \|S_n x - p\| \|Qx - p\| \leq \|x - p\| \|Qx - p\|.$$

Letting $n \rightarrow \infty$ gives

$$\|Qx - p\|^2 \leq \|x - p\| \|Qx - p\|$$

and hence

$$\|Qx - p\| \leq \|x - p\|.$$

□

Recall that a Hilbert space H satisfies the *Opial's condition* (Opial, 1967), that is, for any weakly null sequence $\{x_n\}$ in H ,

$$\limsup_{n \rightarrow \infty} \|x_n\| < \limsup_{n \rightarrow \infty} \|x_n + x\| \quad \text{for all } x \neq 0.$$

Theorem 6 Let C be a closed convex subset of a Hilbert space H and let $T: C \rightarrow C$ be an (a, b) -mean nonexpansive mapping. Then the following are equivalent for all $x \in C$.

- (1) $\{T^n x\}$ is weakly convergent;
- (2) $F(T) \neq \emptyset$ and if $\{T^{n_i} x\}$ is a subsequence of $\{T^n x\}$ such that $T^{n_i} x \xrightarrow{w} y_0 \in C$, then $y_0 \in F(T)$.

Proof. (1) $\Rightarrow$ (2) Suppose that $T^n x \xrightarrow{w} y_0 \in C$. From the Opial's condition, we have $y_0 = T y_0$. Otherwise, we obtain the following contradiction:

$$\begin{aligned} & \limsup_{n \rightarrow \infty} \|T^n x - T y_0\| \\ &= \limsup_{n \rightarrow \infty} \|T^{n+1} x - T y_0\| \\ &\leq \limsup_{n \rightarrow \infty} (a \|T^n x - y_0\| + b \|T^{n+1} x - y_0\|) \\ &\leq (a + b) \limsup_{n \rightarrow \infty} \|T^n x - y_0\| \\ &\leq \limsup_{n \rightarrow \infty} \|T^n x - y_0\|. \end{aligned}$$

(2) $\Rightarrow$ (1) Since $F(T) \neq \emptyset$ is closed and convex, the metric projection $P: H \rightarrow F(T)$ is well-defined. In particular, $P T^n x \rightarrow p \in F(T)$. Since $\{T^n x\}$ is bounded, we may assume that $\{T^{n_i} x\}$ is a subsequence of $\{T^n x\}$ such that $T^{n_i} x \xrightarrow{w} y_0 \in C$. By our assumption, $y_0 \in F(T)$. By the properties of metric projection, for all $i \in \mathbb{N}$

$$\langle T^{n_i} x - P T^{n_i} x, P T^{n_i} x - y_0 \rangle \geq 0.$$

Because $T^{n_i} x \xrightarrow{w} y_0$ and $P T^{n_i} x \rightarrow p$, we have

$$\langle T^{n_i} x - P T^{n_i} x, P T^{n_i} x - p \rangle \rightarrow \langle y_0 - p, p - y_0 \rangle = -\|p - y_0\|^2 \geq 0.$$

It follows then that $y_0 = p$. The double extract subsequence principle implies that the whole sequence $\{T^n x\}$ converges weakly to y_0 , as desired. □

We now prove the demiclosedness principle for mean nonexpansive mappings.

Theorem 7 (Demiclosedness Principle) Let C be a closed convex subset of a Hilbert space H and let $T: C \rightarrow C$ be a mean nonexpansive mapping. Then $I - T$ is demiclosed at zero, that is, if $x_n \xrightarrow{w} x_0$ and $x_n - T x_n \rightarrow 0$, then $x_0 = T x_0$.

Proof. Suppose that T is mean nonexpansive with nonnegative numbers a, b . It follows that

$$\begin{aligned}
 \limsup_{n \rightarrow \infty} \|x_n - Tx_0\| &\leq \limsup_{n \rightarrow \infty} (\|x_n - Tx_n\| + \|Tx_n - Tx_0\|) \\
 &= \limsup_{n \rightarrow \infty} \|Tx_n - Tx_0\| \\
 &\leq \limsup_{n \rightarrow \infty} (a\|x_n - x_0\| + b\|Tx_n - x_0\|) \\
 &\leq \limsup_{n \rightarrow \infty} (a\|x_n - x_0\| + b\|Tx_n - x_n\| + b\|x_n - x_0\|) \\
 &= \limsup_{n \rightarrow \infty} (a\|x_n - x_0\| + b\|x_n - x_0\|) \\
 &\leq \limsup_{n \rightarrow \infty} \|x_n - x_0\|.
 \end{aligned}$$

By the Opial's condition, we have $x_0 = Tx_0$. $\square$

As a consequence of Theorem 7, we obtain a sufficient condition for the weak convergence of a sequence $\{T^n x\}$.

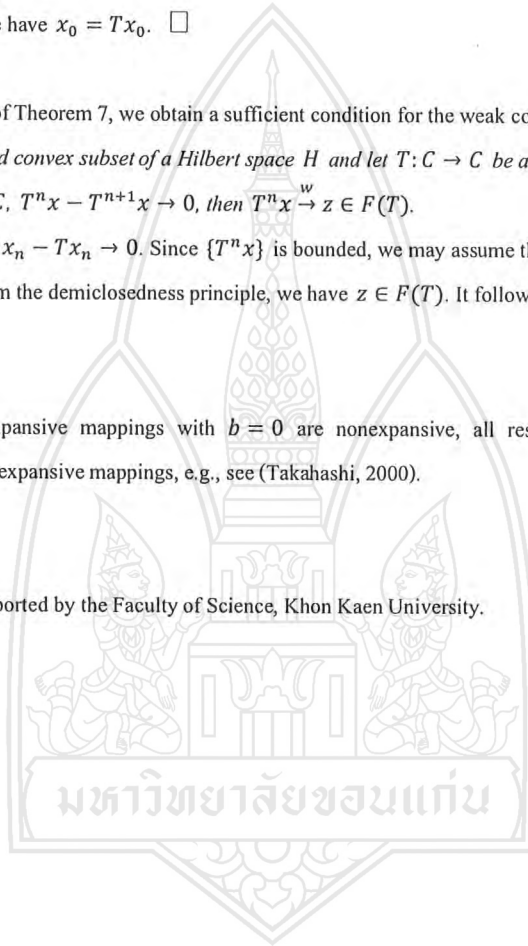
Theorem 8 Let C be a closed convex subset of a Hilbert space H and let $T: C \rightarrow C$ be a mean nonexpansive mapping such that $F(T) \neq \emptyset$. If, for $x \in C$, $T^n x - T^{n+1} x \rightarrow 0$, then $T^n x \xrightarrow{w} z \in F(T)$.

Proof. Let $x_n = T^n x$. Then $x_n - Tx_n \rightarrow 0$. Since $\{T^n x\}$ is bounded, we may assume that there is a subsequence $\{x_{n_i}\}$ of $\{x_n\}$ such that $x_{n_i} \xrightarrow{w} z$. From the demiclosedness principle, we have $z \in F(T)$. It follows from Theorem 6 that $T^n x \xrightarrow{w} z \in F(T)$, as desired. $\square$

Since mean nonexpansive mappings with $b = 0$ are nonexpansive, all results in this paper extends many corresponding results for nonexpansive mappings, e.g., see (Takahashi, 2000).

Acknowledgements

The research is supported by the Faculty of Science, Khon Kaen University.



References

Takahashi, W. (2000). Nonlinear functional analysis. Fixed point theory and its applications. Yokohama: Yokohama Publishers, iv+276 pp.

Wu, C. and Zhang, L.J. (2007). Fixed points for mean non-expansive mappings. Acta Math. Appl. Sin. Engl. Ser. 23(3): 489-494.

Yang, Y. and Cui, Y. (2008). Viscosity approximation methods for mean non-expansive mappings in Banach spaces. Appl. Math. Sci. (Ruse) 2 (13-16): 627-638.

Zhang, S. (1975). About fixed point theory for mean nonexpansive mapping in Banach spaces. Journal of Sichuan University 2: 67-68.





ความสัมพันธ์กรีนและความเป็นปกติของกึ่งกรุป การแปลงเต็มวายนัยทั่วไป

Green's Relations and Regularity of Generalized Full Transformation Semigroups

รณสรณ์ ชินรัมย์¹

บทคัดย่อ

ความสัมพันธ์กรีนได้รับการศึกษาครั้งแรกโดยกรีนในปี ค.ศ. 1951 ความสัมพันธ์เหล่านี้เป็นหลักฐานที่สำคัญในการพัฒนาทฤษฎีทางด้านการแปลงเต็มวายนัยทั่วไป ความสัมพันธ์กรีนมีความสำคัญมากในการศึกษาถึงกรุปปกติ ให้ X เป็นเซตไม่ว่าง และ $T(X)$ เป็นกึ่งกรุปการแปลงเต็มบน X เป็นที่รู้กันดีว่ากึ่งกรุป $T(X)$ เป็นกึ่งกรุปปกติ เพื่อที่จะขยายการศึกษานี้ให้ X และ Y เป็นเซตไม่ว่าง และ $T(X, Y)$ เป็นเซตของการแปลงเต็มทั้งหมดจาก X ไป Y สำหรับ $\theta \in T(Y, X)$ ให้ $(T(X, Y), \theta)$ เป็นกึ่งกรุป $(T(X, Y), *)$ โดยที่ $\alpha * \beta = \alpha\theta\beta$ สำหรับทุก $\alpha, \beta \in T(X, Y)$ วัตถุประสงค์ของบทความนี้จำแนกสมาชิกปกติและจำแนกชั้นสมมูลของความสัมพันธ์กรีน $\mathcal{L}$, $\mathcal{R}$, $\mathcal{H}$ และ $\mathcal{D}$ ของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

Abstract

Green's relations were first studied by Green in 1951. These relations have played a fundamental role in the development of semigroup theory. Green's relations are especially significant in the study of regular semigroups. Let X be a nonempty set and $T(X)$ the full transformation semigroup on X . It is well-known that $T(X)$ is regular. To generalize this semigroups, let X and Y be nonempty sets and $T(X, Y)$ the set of all full transformations from X to Y . For $\theta \in T(Y, X)$, let $(T(X, Y), \theta)$ be a semigroup $(T(X, Y), *)$ where $\alpha * \beta = \alpha\theta\beta$ for all $\alpha, \beta \in T(X, Y)$. Our purpose in this paper is to characterize regular elements and to characterize $\mathcal{L}$ -classes, $\mathcal{R}$ -classes, $\mathcal{H}$ -classes and $\mathcal{D}$ -classes of the semigroup $(T(X, Y), \theta)$.

คำสำคัญ : ความสัมพันธ์กรีน กึ่งกรุปการแปลงเต็มวายนัยทั่วไป สมาชิกปกติ

Keywords : Green's relations, generalized full transformation semigroups, regular elements.

บทนำ

ความสัมพันธ์กรีน (Green's relations) ได้รับการแนะนำและศึกษาครั้งแรกโดยกรีน (Green, 1951) ความสัมพันธ์กรีนเป็นหลักฐานที่สำคัญในการศึกษาทฤษฎีกึ่งกรุป ความสัมพันธ์กรีน $\mathcal{L}$, $\mathcal{R}$, $\mathcal{H}$ และ $\mathcal{D}$ นิยามดังต่อไปนี้

(i) $a \mathcal{L} b$ ก็ต่อเมื่อ $S^1 a = S^1 b$ โดยที่ $S^1 a = Sa \cup \{a\}$

(ii) $a \mathcal{R} b$ ก็ต่อเมื่อ $aS^1 = bS^1$ โดยที่ $aS^1 = aS \cup \{a\}$

(iii) $\mathcal{H} = \mathcal{L} \cap \mathcal{R}$

(iv) $\mathcal{D} = \mathcal{L} \circ \mathcal{H} = \mathcal{H} \circ \mathcal{R}$

เราทราบว่าความสัมพันธ์กรีน $\mathcal{L}$, $\mathcal{R}$, $\mathcal{H}$ และ $\mathcal{D}$ เป็นความสัมพันธ์สมมูล ยิ่งกว่านั้นเรายังทราบอีกว่าแต่ละ $\mathcal{D}$ -ชั้นสมมูลของกึ่งกรุปจะเป็นยูเนียนของ $\mathcal{L}$ -ชั้นสมมูลและเป็นยูเนียนของ $\mathcal{R}$ -ชั้นสมมูลและอินเตอร์เซกชันของ $\mathcal{L}$ -ชั้นสมมูลและ $\mathcal{R}$ -ชั้นสมมูลจะเป็นเซตว่างหรือไม่ก็จะเป็น $\mathcal{H}$ -ชั้นสมมูล สำหรับในบทความนี้ เราจะเขียนแทน $\mathcal{L}$ -ชั้นสมมูล $\mathcal{R}$ -ชั้นสมมูล $\mathcal{H}$ -ชั้นสมมูล และ $\mathcal{D}$ -ชั้นสมมูลที่บรรจุ a ด้วย L_a, R_a, H_a และ D_a ตามลำดับ

เราเรียกสมาชิก a ของกึ่งกรุป S ว่า สมาชิกปกติ (regular element) ของ S ถ้ามี $x \in S$ ซึ่ง $a = axa$ เราเรียกกึ่งกรุป S ว่า กึ่งกรุปปกติ (regular semigroup) ถ้าทุกสมาชิกของ S เป็นสมาชิกปกติ แนวคิดเกี่ยวกับเรื่องความเป็นปกติในทฤษฎีจึงได้รับการแนะนำโดยวอน นอยแมนน์ (von Neumann, 1936) ซึ่งบทนิยามสำหรับกึ่งกรุปเป็นไปในการทำงานเดียวกันสำหรับงานวิจัยที่น่าสนใจเกี่ยวกับสมาชิกปกติของริงของนักคณิตศาสตร์ชาวไทยที่น่าสนใจ เช่น การหาสมาชิกปกติในริง $M_2(\mathbb{Z}_p)$ (สมจิต โชติชัยสถิตย์ และพงศกร ชศแก้ว, 2551) การหาเงื่อนไขที่จำเป็นและเพียงพอสำหรับการที่ริงของการแปลงเชิงเส้นวางนัยทั่วไปเป็นริงปกติ $(L(V, W), +, \theta)$ (Kemprasit, 2002) เป็นต้น เป็นที่ทราบกันว่า ถ้า a เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป S แล้ว ทุกสมาชิกใน D_a เป็นสมาชิกปกติของ S ด้วย (Howie, 1976)

ให้ X เป็นเซตย่อยไม่ว่างและ $T(X)$ เป็นกึ่งกรุปการแปลงเต็มบน X เป็นที่รู้กันว่า $T(X)$ เป็นกึ่งกรุปปกติ (Higgins, 1992) ในการขยายการศึกษานี้ เราให้ X และ Y เป็นเซตไม่ว่างและ $T(X, Y)$ เป็นเซตของการแปลงเต็มจาก X ไป Y สำหรับ $\theta \in T(X, Y)$ เราให้ $(T(X, Y), \theta)$ แทนกึ่งกรุป $(T(X, Y), *)$ โดยที่ $\alpha * \beta = \alpha\theta\beta$ สำหรับทุก $\alpha, \beta \in T(X, Y)$ ทฤษฎีบทต่อไปนี้บอกถึงเงื่อนไขจำเป็นและเพียงพอต่อการที่กึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ เป็นกึ่งกรุปปกติ (Theorem 2.1 ใน (Chinram, 2005) พิจารณา $k = |Y|$)

ทฤษฎีบท 1.1 สำหรับ $\theta \in T(Y, X), (T(X, Y), \theta)$ เป็นกึ่งกรุปปกติ ก็ต่อเมื่อ หนึ่งข้อความจากข้อความต่อไปนี้เป็นจริง

(i) $|X| = 1$

(ii) $|Y| = 1$

(iii) θ เป็นฟังก์ชันหนึ่งต่อหนึ่งทั่วถึง

นอกจากนี้ ยังมีบทความที่ศึกษาเกี่ยวกับสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ (Chanmuang and Chinram, 2008) สำหรับผลงานของนักคณิตศาสตร์ชาวไทยที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์กรีนและความเป็นปกติของกึ่งกรุปที่น่าสนใจ ได้แก่ การศึกษาความสัมพันธ์กรีนของโมนอยด์ของไฮเพอร์สับสติทิวชัน (hypersubstitution) โดย Changphas และ Wismath (2006) การศึกษาความสัมพันธ์กรีนและความเป็นปกติของกึ่งกรุปการแปลงซึ่งเรนจ์ถูกจำกัด โดย Sanwong และ Sommanee (2008) การศึกษาความสัมพันธ์กรีนและความเป็นปกติของกึ่งกรุปการแปลงบางส่วนวางนัยทั่วไปและกึ่งกรุปการแปลงบางส่วนหนึ่งต่อหนึ่งวางนัยทั่วไป โดยผู้เขียนบทความ (Chinram, 2008) เป็นต้น

สำหรับวัตถุประสงค์ของบทความนี้ เพื่อจำแนกสมาชิกปกติและจำแนกชั้นสมมูลของความสัมพันธ์กรีน $\mathcal{L}$, $\mathcal{R}$, $\mathcal{H}$ และ $\mathcal{D}$ ของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

ผลลัพธ์หลัก

ให้ X และ Y เป็นเซตไม่ว่าง สำหรับ $\alpha \in T(X, Y)$ เราเรียกความสัมพันธ์สมมูล

$$\pi_\alpha = \{(a, b) \in X \times X \mid (a)\alpha = (b)\alpha\}$$

ว่า ผลแบ่งกันของ $\text{dom } \alpha$ ซึ่งสมนัยกับ α (the partition of $\text{dom } \alpha$ corresponding to α) เราได้ว่า $\pi_\alpha = \alpha^{-1}\alpha$

ทฤษฎีบท 2.1 ให้ $\alpha \in T(X, Y)$ เราได้ว่า α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ก็ต่อเมื่อ $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ และ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$

การพิสูจน์ สมมติว่า α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ดังนั้น จะมี $\beta \in T(X, Y)$ ซึ่ง $\alpha = \alpha\theta\beta\theta\alpha$ เราได้ว่า

$$\pi_\alpha \subseteq \pi_{\alpha\theta} \subseteq \pi_{\alpha\theta\beta\theta\alpha} = \pi_\alpha \text{ และ } \text{ran } \alpha = \text{ran } \alpha\theta\beta\theta\alpha \subseteq \text{ran } \theta\alpha \subseteq \text{ran } \alpha$$

ดังนั้น $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ และ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$

ในการพิสูจน์อีกด้าน สมมติว่า $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ และ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$ ดังนั้นแต่ละ $y \in \text{ran } \alpha$ จะมี $z_y \in Y$ ซึ่ง $(z_y)\theta\alpha = y$ เนื่องจาก $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ เราจึงได้ว่า $\theta|_{\text{ran } \alpha}$ เป็นฟังก์ชันหนึ่งต่อหนึ่ง ยิ่งกว่านั้น ถ้า $x \in \text{ran } \alpha\theta$ จะมี $y \in \text{ran } \alpha$ เพียงตัวเดียวเท่านั้นซึ่ง $x = (y)\theta$ นิยามการส่ง $\beta: X \rightarrow Y$ โดย

$$(x)\beta = \begin{cases} z_y & ; x = (y)\theta \exists y \in \text{ran } \alpha \\ (x)\alpha & ; x \notin \text{ran } \alpha \end{cases}$$

ดังนั้น สำหรับ $x \in X$ เราได้ว่า

$$(x)\alpha\theta\beta\theta\alpha = ((x)\alpha)\theta\beta\theta\alpha = (z_{(x)\alpha})\theta\alpha = (x)\alpha$$

เราจึงได้ว่า $\alpha\theta\beta\theta\alpha = \alpha$ นั่นคือ α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

บทแทรก 2.2 ให้ $\alpha \in T(X, Y)$ ถ้า $|\text{ran } \alpha| > |\text{ran } \theta|$ แล้ว α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

การพิสูจน์ เพราะว่า $|\text{ran } \theta\alpha| \leq \min\{|\text{ran } \alpha|, |\text{ran } \theta|\} = |\text{ran } \theta| < |\text{ran } \alpha|$ เราจึงได้ว่า $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ โดยทฤษฎีบท 2.1 ทำให้เราได้ว่า α เป็นสมาชิกไม่ปกติ

ทฤษฎีบทต่อไปนี้กล่าวถึง $L_\alpha, R_\alpha, H_\alpha$ และ D_α เมื่อ $|\text{ran } \alpha| = 1$

ทฤษฎีบท 2.3 ให้ $\alpha \in T(X, Y)$ ซึ่ง $|\text{ran } \alpha| = 1$ ข้อความต่อไปนี้เป็นจริง

(i) α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

(ii) $L_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$

(iii) $R_\alpha = D_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid |\text{ran } \beta| = 1\}$

(iv) ทุกสมาชิกใน D_α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

การพิสูจน์ (i) เนื่องจาก $\text{ran } \alpha\theta\beta\theta\alpha \subseteq \text{ran } \alpha$ และ $|\text{ran } \alpha| = 1$ เราจึงได้ว่า $\text{ran } \alpha\theta\beta\theta\alpha = \text{ran } \alpha$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\alpha\theta\beta\theta\alpha = \alpha$

(ii) ให้ $\beta \in L_\alpha$ เราได้ว่า $T(X, Y)^1 \theta \alpha = T(X, Y)^1 \theta \beta$ ดังนั้น จะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)^1$ ซึ่ง $\alpha = \gamma \theta \beta$ และ $\beta = \eta \theta \alpha$ ซึ่งทำให้ได้ว่า $\text{ran } \beta = \text{ran } \alpha$ เนื่องจาก $|\text{ran } \alpha| = 1$ เราจึงได้ว่า $\beta = \alpha$ ดังนั้น $L_\alpha = \{\alpha\}$ เนื่องจาก $H_\alpha = L_\alpha \cap R_\alpha$ เราจึงได้ว่า $H_\alpha = \{\alpha\}$

(iii) ให้ $\beta \in R_\alpha$ เราได้ว่า $\alpha \theta T(X, Y)^1 = \beta \theta T(X, Y)^1$ ดังนั้น จะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)^1$ ซึ่ง $\alpha = \beta \theta \gamma$ และ $\beta = \alpha \theta \eta$ ทำให้เราได้ว่า $|\text{ran } \beta| = |\text{ran } \alpha|$ ดังนั้น $|\text{ran } \beta| = 1$

ในการพิสูจน์อีกด้าน ให้ $\beta \in T(X, Y)$ ซึ่ง $|\text{ran } \beta| = 1$ เราสามารถเห็นได้โดยง่ายว่า $\alpha = \beta \theta \alpha$ และ $\beta = \alpha \theta \beta$ ดังนั้น $\alpha \in \beta \theta T(X, Y)^1$ และ $\beta \in \alpha \theta T(X, Y)^1$ ทำให้ได้ว่า $\alpha \theta T(X, Y)^1 = \beta \theta T(X, Y)^1$ ซึ่งก็คือ $\beta \mathcal{L} \alpha$

จากการพิสูจน์ข้างต้น เราได้ว่า $R_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid |\text{ran } \beta| = 1\}$ และเนื่องจาก $\mathcal{D} = \mathcal{R} \circ \mathcal{L}$ และ $L_\alpha = \{\alpha\}$ เราจึงได้ว่า $D_\alpha = R_\alpha$

(iv) ผลลัพธ์โดยตรงจาก (i)

ทฤษฎีบทต่อไปนี้กล่าวถึง $L_\alpha, R_\alpha, D_\alpha$ และ H_α เมื่อ α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

ทฤษฎีบท 2.4 ให้ α เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ข้อความต่อไปนี้เป็นจริง

(i) $L_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ เป็นสมาชิกปกติและ } \text{ran } \beta = \text{ran } \alpha\}$

(ii) $R_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ เป็นสมาชิกปกติและ } \pi_\alpha = \pi_\beta\}$

(iii) $H_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ เป็นสมาชิกปกติและ } \text{ran } \beta = \text{ran } \alpha \text{ และ } \pi_\alpha = \pi_\beta\}$

(iv) $D_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ เป็นสมาชิกปกติและ } |\text{ran } \beta| = |\text{ran } \alpha|\}$

การพิสูจน์ (i) ให้ $\beta \in L_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกปกติและ $T(X, Y)^1 \theta \alpha = T(X, Y)^1 \theta \beta$ ดังนั้นจะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)^1$ ซึ่ง $\alpha = \gamma \theta \beta$ และ $\beta = \eta \theta \alpha$ ดังนั้น $\text{ran } \beta = \text{ran } \alpha$

ในการพิสูจน์อีกด้าน ให้ $\beta \in T(X, Y)$ ซึ่ง β เป็นสมาชิกปกติและ $\text{ran } \beta = \text{ran } \alpha$ เนื่องจาก β เป็นสมาชิกปกติทำให้ได้ว่า $\text{ran } \theta \beta = \text{ran } \beta$ ดังนั้น $\text{ran } \theta \beta = \text{ran } \alpha$ เราได้ว่าแต่ละ $y \in \text{ran } \alpha$ จะมี $z_y \in Y$ ซึ่ง $(z_y) \theta \beta = y$ นิยามการส่ง $\varphi: X \rightarrow Y$ โดย

$$(x) \varphi = z_{(x) \alpha} \quad \text{สำหรับทุก } x \in X$$

ดังนั้น แต่ละ $x \in X$ เราได้ว่า

$$(x) \varphi \theta \beta = (z_{(x) \alpha}) \theta \beta = (x) \alpha$$

ดังนั้น $\varphi \theta \beta = \alpha$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\alpha \in T(X, Y)^1 \theta \beta$ ในทำนองเดียวกัน $\beta \in T(X, Y)^1 \theta \alpha$ ดังนั้น $T(X, Y)^1 \theta \alpha = T(X, Y)^1 \theta \beta$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\beta \mathcal{L} \alpha$

(ii) ให้ $\beta \in R_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกปกติและ $\alpha \theta T(X, Y)^1 = \beta \theta T(X, Y)^1$ ดังนั้น จะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)^1$ ซึ่ง $\alpha = \beta \theta \gamma$ และ $\beta = \alpha \theta \eta$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\pi_\alpha = \pi_\beta$

ในการพิสูจน์อีกด้าน ให้ $\beta \in T(X, Y)$ เป็นสมาชิกปกติและ $\pi_\alpha = \pi_\beta$ ดังนั้น $\pi_{\beta \theta} = \pi_\beta = \pi_\alpha$ เราได้ว่าแต่ละ $x \in \text{ran } \beta \theta$ จะมี $a_x \in X$ ซึ่ง $(a_x) \beta \theta = x$ นิยามการส่ง $\varphi: X \rightarrow Y$ โดย

$$(x) \varphi = \begin{cases} (a_x) \alpha & ; x \in \text{ran } \beta \theta \\ (x) \alpha & ; x \notin \text{ran } \beta \theta \end{cases}$$

ดังนั้น $(a_x) \alpha = (x) \varphi = (a_x) \beta \theta$ สำหรับทุก $x \in \text{ran } \beta \theta$ เนื่องจาก $\pi_{\beta \theta} = \pi_\alpha$ เราจึงได้ว่า $\alpha = \beta \theta \varphi$ ดังนั้น $\alpha \in \beta \theta T(X, Y)^1$ ในทำนองเดียวกัน $\beta \in \alpha \theta T(X, Y)^1$ ดังนั้น $\alpha \theta T(X, Y)^1 = \beta \theta T(X, Y)^1$ ซึ่งนั่นคือ $\beta \mathcal{R} \alpha$

(iii) เป็นผลโดยตรงจาก (i) และ (ii)

(iv) ให้ $\beta \in D_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกปกติและจะมี $\gamma \in T(X, Y)$ ซึ่ง $\alpha \mathcal{L} \gamma$ และ $\gamma \mathcal{R} \beta$ โดย (i) และ (ii) เราได้ว่า $\text{ran } \gamma = \text{ran } \beta$ และ $\pi_\alpha = \pi_\gamma$ เนื่องจาก $\pi_\alpha = \pi_\gamma$ เราจึงได้ว่า $|\text{ran } \alpha| = |\text{ran } \gamma|$ ดังนั้น $|\text{ran } \beta| = |\text{ran } \alpha|$

ในการพิสูจน์อีกด้าน ให้ β เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ และ $|\text{ran } \beta| = |\text{ran } \alpha|$ ดังนั้น จะมีฟังก์ชันหนึ่งต่อหนึ่งทั่วถึง $\varphi: \text{ran } \beta \rightarrow \text{ran } \alpha$ ให้ $\gamma = \beta\varphi$ เราได้ว่า $\text{ran } \gamma = \text{ran } \alpha$ และ $\pi_\gamma = \pi_\beta$ ดังนั้น $\alpha \mathcal{L} \beta$ และ $\alpha \mathcal{R} \beta$ ฉะนั้น $\alpha \mathcal{D} \beta$

จากทฤษฎีบท 2.1 เราได้ว่า ถ้า α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ แล้ว α สอดคล้องกับหนึ่งข้อความจากสามข้อสามต่อไปนี้อย่างน้อยข้อหนึ่ง

- (i) $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ แต่ $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$
- (ii) $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ แต่ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$
- (iii) $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ และ $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$

บทตั้ง 2.5 ให้ α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ข้อความต่อไปนี้เป็นจริง

- (i) ถ้า $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ แล้ว $R_\alpha = \{\alpha\}$
- (ii) ถ้า $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ แล้ว $L_\alpha = \{\alpha\}$
- (iii) ถ้า $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ แล้ว $R_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ เป็นสมาชิกไม่ปกติ } \pi_\alpha = \pi_{\beta\theta} \text{ and } \pi_{\alpha\theta} = \pi_\beta\}$
- (iv) ถ้า $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$ แล้ว $L_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ เป็นสมาชิกไม่ปกติ } \text{ran } \theta\beta = \text{ran } \alpha \text{ และ } \text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \beta\}$

การพิสูจน์ (i) สมมติให้ $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ และให้ $\beta \in R_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกไม่ปกติและ $\alpha\theta T(X, Y)^1 = \beta\theta T(X, Y)^1$ ซึ่งทำให้ได้ว่า $\alpha = \beta$ หรือมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)$ ซึ่ง $\alpha = \beta\theta\gamma$ และ $\beta = \alpha\theta\eta$ สมมติว่า $\alpha \neq \beta$ ดังนั้น $\alpha = \beta\theta\gamma = \alpha\theta\eta\theta\gamma$ ซึ่งทำให้ได้ว่า $\pi_{\alpha\theta} \subseteq \pi_\alpha$ เนื่องจากเราเห็นได้ชัดเจนว่า $\pi_\alpha \subseteq \pi_{\alpha\theta}$ เราจึงได้ว่า $\pi_{\alpha\theta} = \pi_\alpha$ ซึ่งขัดแย้งกับข้อสมมติ ดังนั้น $\beta = \alpha$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $R_\alpha = \{\alpha\}$

(ii) สมมติให้ $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ และให้ $\beta \in L_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกไม่ปกติและ $T(X, Y)^1\theta\alpha = T(X, Y)^1\theta\beta$ ดังนั้น $\alpha = \beta$ หรือจะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)$ ซึ่ง $\alpha = \gamma\theta\beta$ และ $\beta = \eta\theta\alpha$ สมมติให้ $\alpha \neq \beta$ ดังนั้น $\alpha = \gamma\theta\beta = \gamma\theta\eta\theta\alpha$ เราได้ว่า $\text{ran } \alpha \subseteq \text{ran } \theta\alpha$ เนื่องจากเราเห็นได้ชัดเจนว่า $\text{ran } \alpha\theta \subseteq \text{ran } \alpha$ ทำให้เราได้ว่า $\text{ran } \alpha = \text{ran } \theta\alpha$ เกิดการขัดแย้งกับข้อสมมติ ทำให้เราได้ว่า $\beta = \alpha$ ดังนั้น $L_\alpha = \{\alpha\}$

(iii) สมมติให้ $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ และให้ $\beta \in R_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกไม่ปกติและ $\alpha\theta T(X, Y)^1 = \beta\theta T(X, Y)^1$ ดังนั้น จะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)^1$ ซึ่ง $\alpha = \beta\theta\gamma$ และ $\beta = \alpha\theta\eta$ ทำให้ได้ว่า $\pi_{\beta\theta} \subseteq \pi_\alpha$ และ $\pi_{\alpha\theta} \subseteq \pi_\beta$ ดังนั้น $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta} \subseteq \pi_\beta \subseteq \pi_{\beta\theta}$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\pi_\alpha = \pi_{\beta\theta}$ และ $\pi_{\alpha\theta} = \pi_\beta$

ในทางกลับกัน ให้ $\beta \in T(X, Y)$ ซึ่ง β เป็นสมาชิกไม่ปกติ $\pi_\alpha = \pi_{\beta\theta}$ และ $\pi_{\alpha\theta} = \pi_\beta$ ดังนั้น แต่ $x \in \text{ran } \beta\theta$ จะมี $a_x \in X$ ซึ่ง $(a_x)\beta\theta = x$ นิยามการส่ง $\varphi: X \rightarrow Y$ โดย

$$(x)\varphi = \begin{cases} (a_x)\alpha & ; x \in \text{ran } \beta\theta \\ (x)\alpha & ; x \notin \text{ran } \beta\theta \end{cases}$$

ดังนั้น $(a_x)\alpha = (a_x)\beta\theta\varphi$ สำหรับทุก $x \in \text{ran } \beta\theta$ เนื่องจาก $\pi_{\beta\theta} = \pi_\alpha$ เราจึงได้ว่า $\alpha = \beta\theta\varphi$ ดังนั้น $\alpha \in \beta\theta T(X, Y)^1$ ในทำนองเดียวกัน $\beta \in \alpha\theta T(X, Y)^1$ ดังนั้น $\alpha\theta T(X, Y)^1 = \beta\theta T(X, Y)^1$ ซึ่งนั่นคือ $\beta \mathcal{R} \alpha$

(iv) สมมติให้ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$ และให้ $\beta \in L_\alpha$ ดังนั้น β เป็นสมาชิกไม่ปกติและ $T(X, Y)^1 \theta\alpha = T(X, Y)^1 \theta\beta$ ดังนั้น จะมี $\gamma, \eta \in T(X, Y)^1$ ซึ่ง $\alpha = \gamma\theta\beta$ และ $\beta = \eta\theta\alpha$ เราจะได้ว่า $\text{ran } \alpha \subseteq \text{ran } \theta\beta \subseteq \text{ran } \beta \subseteq \text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\text{ran } \theta\beta = \text{ran } \alpha$ และ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \beta$

ในการพิสูจน์อีกด้านหนึ่ง ให้ $\beta \in T(X, Y)$ ซึ่ง β เป็นสมาชิกไม่ปกติ $\text{ran } \theta\beta = \text{ran } \alpha$ และ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \beta$ ดังนั้น แต่ละ $y \in \text{ran } \alpha$ จะมี $z_y \in Y$ ซึ่ง $(z_y)\theta\beta = y$ นิยามการส่ง $\varphi: X \rightarrow Y$ โดย

$$(x)\varphi = z_{(x)\alpha} \text{ สำหรับทุก } x \in X$$

ดังนั้น แต่ละ $x \in X$ เราได้ว่า

$$(x)\varphi\theta\beta = (z_{(x)\alpha})\theta\beta = (x)\alpha$$

เราจึงได้ว่า $\varphi\theta\beta = \alpha$ ดังนั้น $\alpha \in T(X, Y)^1 \theta\beta$ ในทำนองเดียวกัน $\beta \in T(X, Y)^1 \theta\alpha$ เราได้ว่า $T(X, Y)^1 \theta\alpha = T(X, Y)^1 \theta\beta$ ซึ่งทำให้เราได้ว่า $\beta \mathcal{L} \alpha$

ต่อไปเราจะจำแนก $L_\alpha, R_\alpha, D_\alpha$ และ H_α เมื่อ α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ เราได้ว่าบทแทรก 2.6 - 2.8 เป็นผลโดยตรงจากบทตั้ง 2.5

บทแทรก 2.6 ให้ α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ซึ่ง $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ แต่ $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ เราได้ว่า

- (i) $R_\alpha = D_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ ไม่เป็นสมาชิกปกติ, } \pi_\alpha = \pi_{\beta\theta} \text{ และ } \pi_{\alpha\theta} = \pi_\beta\}$
- (ii) $L_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$

บทแทรก 2.7 ให้ α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ซึ่ง $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ แต่ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$ เราได้ว่า

- (i) $R_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$
- (ii) $L_\alpha = D_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ ไม่เป็นสมาชิกปกติ, } \text{ran } \theta\beta = \text{ran } \alpha \text{ และ } \text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \beta\}$

บทแทรก 2.8 ให้ α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ซึ่ง $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ และ $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ เราได้ว่า

$$L_\alpha = R_\alpha = D_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$$

เราได้ว่า ถ้า $|\text{ran } \alpha| > |\text{ran } \theta|$ แล้ว $\pi_\alpha \neq \pi_\beta$ และ $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ บทแทรกต่อไปนี้เป็นผลพลอยได้จาก

บทแทรก 2.9

บทแทรก 2.9 ให้ α เป็นสมาชิกของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ซึ่ง $|\text{ran } \alpha| > |\text{ran } \theta|$ เราได้ว่า $L_\alpha = R_\alpha = D_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$

รูปภาพกล่องไข่ (egg-box) ของบางกึ่งกรุปการแปลงเต็มวงนัยทั่วไป

ในหัวข้อนี้ได้แจกแจงสมาชิกของกึ่งกรุป $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลในรูปของรูปภาพกล่องไข่ ซึ่งได้รับการแนะนำโดย คลิฟฟอร์ด และ เพลสตัน (Clifford and Preston, 1961) ซึ่งเราพบว่าแต่ละแถวของรูปภาพกล่องไข่จะเป็น $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลหนึ่ง แต่ละคอลัมน์ของรูปภาพกล่องไข่จะเป็น $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลหนึ่งและแต่ละเซลล์จะเป็น $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลหนึ่ง

ตัวอย่างต่อไปนี้จะแสดงให้เห็นถึงรูปภาพกล่องไข่ของบางกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$

ตัวอย่าง 3.1 ให้ $X = \{a, b\}, Y = \{x, y\}$ และ $\theta = \begin{pmatrix} x & y \\ a & b \end{pmatrix} \in T(X, Y)$ เราเห็นได้ชัดแล้วว่า θ เป็นฟังก์ชันหนึ่งต่อหนึ่งทั่วถึง โดยทฤษฎีบท 1.1 เราได้ว่า $(T(X, Y), \theta)$ เป็นกึ่งกรุปปกติ โดยทฤษฎีบท 2.4 เราได้ว่ากึ่งกรุปนี้มี 2 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

$$\left[\begin{pmatrix} a & b \\ x & x \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b \\ y & y \end{pmatrix} \right] = \left[\begin{pmatrix} a & b \\ x & y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b \\ y & x \end{pmatrix} \right]$$

ตัวอย่าง 3.2 ให้ $X = \{a, b, c\}, Y = \{x, y\}$ และ $\theta = \begin{pmatrix} x & y \\ a & b \end{pmatrix} \in T(X, Y)$ เห็นได้ชัดแล้วว่า θ ไม่เป็นฟังก์ชันทั่วถึง โดยทฤษฎีบท 1.1 เราได้ว่า $(T(X, Y), \theta)$ ไม่เป็นกึ่งกรุปปกติ จากทฤษฎีบท 2.1 เราได้ว่า $\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & x \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & y \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & x \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & x \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & y \end{pmatrix}$ และ $\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & y \end{pmatrix}$ เป็นสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ แต่ $\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & y \end{pmatrix}$ และ $\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & x \end{pmatrix}$ เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ เราได้ว่ากึ่งกรุปนี้มี 3 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

$$\left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & x \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & y \end{pmatrix} \right] = \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & y \end{pmatrix} \right]$$

$$\left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & y \end{pmatrix} \right] = \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & x \end{pmatrix} \right]$$

ตัวอย่าง 3.3 ให้ $X = \{a, b, c\}, Y = \{x, y, z\}$ และ $\theta = \begin{pmatrix} x & y & z \\ a & b & b \end{pmatrix} \in T(X, Y)$ เราเห็นได้ชัดแล้วว่า θ ไม่เป็นฟังก์ชันหนึ่งต่อหนึ่ง โดยทฤษฎีบท 1.1 เราได้ว่า $(T(X, Y), \theta)$ ไม่เป็นกึ่งกรุปปกติ เราได้ว่ากึ่งกรุปนี้มี 12 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

1. โดยทฤษฎีบท 2.5 เราพบว่า มี $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลปกติ 2 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

$$\left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & x \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & y \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & z & z \end{pmatrix} \right] = \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ x & z & x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ z & x & z \end{pmatrix} \right]$$

$$\left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ x & z & z \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a & b & c \\ z & x & x \end{pmatrix} \right]$$

2. โดยบทแทรก 2.6 เราทราบว่า ถ้า α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X, Y), \theta)$ ซึ่ง $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ แต่ $\pi_\alpha = \pi_{\alpha\theta}$ แล้ว $R_\alpha = D_\alpha = \{\beta \in T(X, Y) \mid \beta \text{ ไม่เป็นสมาชิกปกติ } \pi_\alpha = \pi_{\beta\theta} \text{ และ } \pi_{\alpha\theta} = \pi_\beta\}$ และ $L_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$ เราจึงได้ว่า $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลลักษณะดังกล่าว 1 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

$$\left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & y \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & x \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & x & z \end{pmatrix} \right] \left[\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & z & x \end{pmatrix} \right]$$

3. โดยบทแทรก 2.7 เราทราบว่า ถ้า α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X,Y),\theta)$ ซึ่ง $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ แต่ $\text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \alpha$ แล้ว $R_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$ และ $L_\alpha = D_\alpha = \{\beta \in T(X,Y) \mid \beta \text{ ไม่เป็นสมาชิกปกติ } \text{ran } \theta\beta = \text{ran } \alpha \text{ และ } \text{ran } \theta\alpha = \text{ran } \beta\}$ เราจึงได้ว่า $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลลักษณะดังกล่าว 1 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

$\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & z & y \end{pmatrix}$
$\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & y & z \end{pmatrix}$
$\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & z & z \end{pmatrix}$
$\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & y & y \end{pmatrix}$

4. โดยบทแทรก 2.8 เราทราบว่า ถ้า α เป็นสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X,Y),\theta)$ ซึ่ง $\pi_\alpha \neq \pi_{\alpha\theta}$ และ $\text{ran } \theta\alpha \neq \text{ran } \alpha$ เราได้ว่า $L_\alpha = R_\alpha = D_\alpha = H_\alpha = \{\alpha\}$ เราจึงได้ว่า $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูลลักษณะดังกล่าว 8 $\mathcal{S}$ -ชั้นสมมูล ดังนี้

$\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & y & z \end{pmatrix}$							
	$\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & z & y \end{pmatrix}$						
		$\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & y & z \end{pmatrix}$					
			$\begin{pmatrix} a & b & c \\ x & z & y \end{pmatrix}$				
				$\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & x & z \end{pmatrix}$			
					$\begin{pmatrix} a & b & c \\ y & z & x \end{pmatrix}$		
						$\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & x & y \end{pmatrix}$	
							$\begin{pmatrix} a & b & c \\ z & y & x \end{pmatrix}$

เราพบว่าจำนวนของสมาชิกปกติของกึ่งกรุป $(T(X,Y),\theta)$ 11 สมาชิก (ในข้อ 1) และจำนวนของสมาชิกไม่ปกติของกึ่งกรุป $(T(X,Y),\theta)$ 16 สมาชิก (ในข้อ 2-4)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้พิจารณาบทความนี้ และขอขอบพระคุณภาควิชาคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- สมจิต โขติชัยสถิตย์ และ พงศกร ยศแก้ว. (2551). การจำแนกสมาชิกนิพจน์ สมาชิกที่หาตัวผกผันได้และสมาชิกปกติในริง $M_2(Z_p)$. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 36(3): 226-232.
- Changphas, T. and Wismath, S. L. (2006). Green's relations on the monoid of regular hyper-substitutions. *Algebra Colloquium*. 13(4): 623-632.
- Chanmuang, P. and Chinram, R. (2008). Some remarks on regularity of generalized transformation semigroups. *International Journal of Algebra*. 2(4): 581-584.
- Chinram, R. (2005). Generalized transformation semigroups whose sets of bi-ideals and quasi-ideals coincide. *Kyungpook Mathematical Journal*. 45(2): 161-166.
- Chinram, R. (2008). Regularity and Green's relations of generalized partial transformation semigroups. *Asian-European Journal of Mathematics*. 1(3): 295-302.
- Chinram, R. (2008). Regularity and Green's relations of generalized one-to-one partial transformation semigroups. *Far East Journal of Mathematical Sciences*. 30(3): 513-521.
- Clifford, A. H. and Preston, G. B. (1961). The algebraic theory of semigroups, vol. I. *Math. Surveys of the American Math. Soc. Providence, R. I.*
- Green, J. A. (1951). On the structure of semigroups. *Annals of Mathematics*. 54: 163-172.
- Higgins, P. (1992). *Techniques of Semigroup Theory*. Oxford-New York-Tokyo: Oxford University Press. p. 14.
- Howie, J. M. (1976). *An introduction to semigroup theory*. Academic Press. London. p. 44.
- Kemprasit, Y. (2002). Regularity and unit-regularity of generalized semigroups of linear transformations. *Southeast Asian Bulletin of Mathematics*. 25(4): 617-622.
- Sanwong, J. and Sommanee, W. (2008). Regularity and Green's relations on a semigroup of transformations with restricted range. *International of Mathematics and Mathematical Sciences*. Article ID 794213: p. 11.
- von Neumann, J. (1936). On regular ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 22: 707-713.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่ งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการ ย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ Angsana New
 - 1.1 ชื่อเรื่อง ขนาดตัวอักษร 20 ตัวเข้ม ตำแหน่งตรงกลาง มีทั้งชื่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
 - 1.2 ชื่อผู้เขียน ขนาดตัวอักษร 16 เอน ตำแหน่งขวาสุด และใส่หมายเลขไว้ท้ายนามสกุล เพื่อการระบุที่อยู่ด้านล่าง
 - 1.3 หัวข้อใหญ่ในแต่ละส่วน ขนาดตัวอักษร 16 ตัวเข้ม ตำแหน่งซ้ายสุด ยกเว้น บทคัดย่อ และ Abstract อยู่ตรงกลาง หัวข้อย่อยตามความเหมาะสม
 - 1.4 เนื้อความ ขนาดตัวอักษร 14
 - 1.5 คำว่า รูปที่ x และตารางที่ x ขนาดตัวอักษร 14 ตัวเข้ม ส่วนข้อความบรรยายต่อท้ายตัวปกติ
 - 1.6 ที่อยู่ ขนาดอักษร 12
 - 1.7 ช่องว่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน
 - 1.8 พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด (ไม่ต้องส่งแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดีในขั้นตอนนี้ เมื่อได้รับแจ้งว่าได้ลงพิมพ์แล้ว ผู้เขียนส่งฉบับแก้ไข 1 ชุด พร้อมแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดี)
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะทำสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
 4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
 5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
 6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนและภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษตลอดทั้งการเขียนตัวสะกด การันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์

8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก้ไขความเฉพาะตอนในบทความ

9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม

10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

11. หากไม่ปฏิบัติตามข้อแนะนำในการเขียนบทความ บทความของท่านอาจไม่ได้รับการตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ล่าช้า

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

E-mail: somkly@kku.ac.th, psupha@kku.ac.th

อนินันทนการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 1 เล่ม

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.)
ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

บรรจง เชื้อเมืองพาน¹ วิรัช ว่องพัฒนานกุล² และ ปวีณา พงษ์คนตรี^{1*}

[illegible][illegible][illegible]

รูปที่ 1 xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

ตารางที่ 1 xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
^{*} Corresponding Author, E-mail:

² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

* Corresponding Author, E-mail:

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานี้ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้ในเนื้อหาเท่านั้น หากอ้างอิงจากเล่มภาษาไทย ต้องเขียนทั้งชื่อและนามสกุล

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.) ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

ชื่อหน่วยราชการ. (เลขปี พ.ศ. หรือ ค.ศ.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์.

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

หมายเหตุ

- กรณีที่เป็นการอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จุลสาร หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
- กรณีที่มีผู้เขียน 2 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เติมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- กรณีที่มีผู้เขียนมากกว่า 2 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ (เฉพาะในเนื้อหาเท่านั้น)
- ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น



