การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักแบบแบตช์

นางสาวสุกัญญา เกิดสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Enterobacter cloacae* UV1-9 IN BATCH FERMENTER

Miss Sukanya Kerdsuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักแบบแบตช์
โดย	นางสาวสุกัญญา เกิดสุข
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…….. ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป)

…….. กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

…….. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัญ ผลประไพ)

สุกัญญา เกิดสุข : การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักแบบแบตช์ (EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Enterobacter cloacae* UV1-9 IN BATCH FERMENTER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 147 หน้า.

แม้ว่าจะมีการใช้พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวางแต่ประเทศไทยยังต้องนำเข้าสารดังกล่าวสำหรับการใช้งานอยู่ ในห้องปฏิบัติการได้มีการพัฒนางานด้านนี้มาได้ระดับหนึ่งเพื่อการผลิตพอลิเมอร์ขึ้นเองในประเทศ หนึ่งในงานวิจัยที่ดำเนินการต่อคือการเพิ่มผลผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดเลือก ในการนี้ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่แยกได้จากสวนผลไม้ได้รับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ *E. cloacae* UV1-9 แล้วเพิ่มขนาดการเลี้ยงในกระบวนการหมักแบบแบตช์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวสูตรปรับ ปรุงซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ภายใต้ ภาวะการผลิตที่ควบคุมความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไร ด์สูงสุดเท่ากับ 9.917 กรัมต่อลิตร ในเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าถึง 9 เท่า โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (μ) เท่ากับ 0.1605 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการใช้น้ำตาลซูโครสจำเพาะ (γ) เท่ากับ 1.9214 กรัมซูโครสต่อลิตรชั่วโมง อัตราการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะ(ρ) เท่ากับ 0.5896 กรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรชั่วโมง ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.0453 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.3060 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีความสามารถในการผลิต เท่ากับ 0.3305 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ พบว่า เป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลกาแลคโทส และไซโลสเพียงเล็กน้อย มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้องและมีความหนืดสูง นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันจากพืช และสารประกอบไฮโดร คาร์บอน มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 88 % และ 3.6% ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา....2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072657623 : MAJOR INDUSTRIAL MIROBIOLOGY

KEYWORDS: MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDE / *Enterobacter cloacae* / CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS

SUKANYA KERDSUK : EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Enterobacter cloacae* UV1-9 IN BATCH FERMENTER. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D., 147 pp.

Despite the wide usage of microbial polymer in numerous industries, Thailand still has to import these products for her usages. Some groundwork have been laid in our laboratory in an attempt to produce such polymer, one of the extension of this is to increase the exopolysaccharide yield of the selected bacterium. *Enterobacter cloacae* EN02, an bacterium isolated from fruit orchard was further mutated by UV induction and eventually gave rise of strain UV1-9, a high EPS producer. Scaling up of strain UV 1-9 in a 5 L bioreactor via batch fermentation using optimal conditions of 30^0C, pH 7.0, aeration rate of 1 vvm and agitation rate of 200 rpm for 36 hr using yeast extract as the only sole nitrogen source, the organism was able to produced exopolysaccharide at 9.917g/L, a nine times higher yield than its corresponding wild type. Results from their characterization including specific growth rate, specific consumption rate, specific production rate, $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ and productivity of 0.1605 $gL^{-1}h^{-1}$, 1.9214 $gL^{-1}h^{-1}$, 0.5896 $gL^{-1}h^{-1}$, 0.0453 $gL^{-1}h^{-1}$, 0.3060 $gL^{-1}h^{-1}$ and 0.3305 $gL^{-1}h^{-1}$ respectively. Further physical and chemical characterizations revealed the polymer as an acidic heteropolysaccharide in nature with glucose, galactose and xylose in its content. As for its physical properties, this exopolysaccharide exhibited a rather heat stable nature 180-690^0C with emulsifying property upon testing against plant oil and hydrocarbon compound as well as flocculating activity. The polymer also showed good water solubility at room temperature with a clear gel appearance, viscous and high water holding capacity. Further study revealed that the EPS isolated possessed carbohydrate and protein contents of 88% and 3.6%, respectively.

Department : .....Microbiology…….....Student's Signature.....

Field of Study : .....Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....

Academic Year : ..2011…….....Co-Advisor's Signature……

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัญ ผลประไพ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้คำแนะนำ อำนวยความสะดวก และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุด หนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

ขอขอบคุณพี่ณฤดี อัศวเสรีเลิศ คุณวรรษมน นิลสันเทียะ คุณอัมทิกา เมืองวงษ์ คุณนิโรบล เหลาก ลม คุณรพี สินเนืองนอง คุณสาคร อนุลีจันทร์ และผองเพื่อนตั้งแต่ชั้นมัธยมศึกษาทุกๆคน ที่คอยให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย และทำให้มีช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาคจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่ คอยสนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆด้าน คอยให้คำปรึกษา และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฏ

สารบัญภาพ..... ฑ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ถ

บทที่

1. บทนำ……..... 1

1.1 ประวัติความเป็นมา……..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……... 3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…… 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม……..... 4

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)……... 4

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (microbial polysaccharide)……..... 8

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 12

2.4 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขยายส่วน……..... 17

2.5 ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ..... 20

2.6 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์..... 26

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย…… 28

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย…….. 28

3.2 เคมีภัณฑ์..... 30

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย……... 32

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 32

3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 33

บทที่ หน้า

3.3.2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น..... 32
3.3.2.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว..... 33
3.3.3 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย..... 33
3.3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 33
3.3.3.2 การผลิต สกัดแยก และการทำพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 34
3.3.4 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ..... 34
3.3.4.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ..... 34
3.3.4.2 ศึกษาความเสถียรของเชื้อ..... 35
3.3.5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า..... 35
3.3.5.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 35
3.3.5.2 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน..... 36
3.3.5.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง..... 36
3.3.5.4 การวิเคราะห์น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์..... 37
3.3.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)..... 37
3.3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kemper 37
3.3.6 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก..... 38
3.3.6.1 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 38
3.3.6.2 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 38
3.3.6.3 ศึกษาอัตราเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 39
3.3.6.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 39
3.3.6.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก..... 40

บทที่ หน้า

3.3.7 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์..... 40
3.3.7.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์..... 40
3.3.7.1.1 ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยกรดซัลฟูริก..... 40
3.3.7.1.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี..... 41
3.3.7.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)..... 41
3.3.7.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography..... 42
3.3.7.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)..... 42
3.3.7.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์..... 42
3.3.7.6 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ..... 43
3.3.7.7 การศึกษาความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์..... 43
3.3.7.8 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์..... 44
3.3.7.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์..... 44
3.3.7.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid..... 44
3.3.7.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding..... 45
3.3.7.10 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์..... 45

บทที่	หน้า
4. ผลการทดลอง.....	46
4.1 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ.....	46
4.1.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ.....	47
4.1.2 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์.....	48
4.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า.....	50
4.2.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์.....	50
4.2.2 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.3 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก.....	63
4.3.1 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน.....	63
4.3.2 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	68
4.3.3 ศึกษาอัตราเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	73
4.3.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	78
4.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์.....	80
4.4.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์.....	80
4.4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส.....	82
4.4.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography.....	85
4.4.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test).....	86
4.4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์.....	87
4.4.6 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ.....	89

บทที่ หน้า

4.4.7 การศึกษาความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์..... 90
4.4.8 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์..... 91
4.4.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์..... 92
4.4.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid..... 92
4.4.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding..... 92
4.4.10 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์..... 93
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 94
รายการอ้างอิง..... 104
ภาคผนวก..... 116
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 117
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง..... 119
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 122
ภาคผนวก ง ข้อมูลเกี่ยวกับถังหมัก..... 125
ภาคผนวก จ การเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ภาวะต่างๆ..... 127
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 147

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	พอลิแซ็กคาไรด์จากพืช สาหร่าย และจุลินทรีย์	5
2.2	จุลินทรีย์และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้	9
2.3	ตัวอย่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่างๆ ในอุตสาหกรรม.....	16
2.4	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ.....	19
2.5	สมบัติต่างๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	21
4.1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน.....	49
4.2	ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อมีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน.....	50
4.3	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200.....	55
4.4	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (AY) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200.....	62
4.5	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y).....	67
4.6	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm.....	72

ตารางที่		หน้า
4.7	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราความเร็วในการกวนของใบพัดที่ 200 400 และ600.....	77
4.8	ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9.....	80
4.9	แสดงอุณหภูมิการย่อยสลายที่จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9.....	82
4.11	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9.....	85
4.12	ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9.....	86
4.13	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืชในอัตราส่วน 1:1.....	87
4.14	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9.....	92
4.15	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9.....	92
4.16	ค่าความหนืดของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก.....	93
5.1	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ.....	103

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ……	4
2.2	โครงสร้างของเดกซ์แทรน.....	9
2.3	โครงสร้างของเคอร์ดแลน.....	10
2.4	โครงสร้างของเจลแลน.....	10
2.5	โครงสร้างของแซนแทน.....	11
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และค่าความเป็นกรดเบส ของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV19……..	47
4.2	ความเสถียรของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 เป็นเวลา 150 วัน……..	49
4.3	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..	51
4.4	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200……..	51
4.5	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง…….....	52
4.6	เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อ เลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200……..	53
4.7	เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..	53
4.8	เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..	54

ภาพที่ หน้า

4.9 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..... 57

4.10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..... 57

4.11 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……. 58

4.12 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200……..... 59

4.13 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……. 60

4.14 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Yเป็นเวลา 48 ชั่วโมง…….. 61

ภาพที่ หน้า

4.15 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 63

4.16 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 64

4.17 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 65

4.18 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 66

4.19 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 69

4.20 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง..... 70

4.21 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... .. 70

ภาพที่ หน้า

4.22 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง..... 71

4.23 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 71

4.24 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 74

4.25 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา24 ชั่วโมง..... 75

4.26 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 75

4.27 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง..... 76

4.28 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 76

4.29 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm และอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm..... 79

4.30 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที..... 80

ภาพที่ หน้า

4.31 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (ไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที..... 81

4.32 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E.cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน..... 83

4.33 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E.cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมักโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน..... 84

4.34 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ..... 88

4.35 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ..... 89

4.36 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 90

4.37 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 90

4.38 ลักษณะตะกอนสีขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ภายหลังการเติมสารละลาย Cetylpyridiniumchloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล..... 91

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
rpm	=	รอบต่อนาที
vvm	=	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรอากาศต่อนาที
gL^{-1}	=	กรัมต่อลิตร
^{0}C	=	องศาเซลเซียส

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยมอนอแซ็กคาไรด์หลายๆโมเลกุลเชื่อมต่อกัน พอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิต ได้แก่ แป้ง เซลลูโลส และไกลโคเจน ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีทั้งที่ได้จากธรรมชาติ และสังเคราะห์ขึ้น มีทั้งที่ผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยแหล่งใหญ่ๆผลิตได้จากพืช สำหรับจุลินทรีย์นั้นเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญเช่นกัน เพราะสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแตกต่างกันกว่า 200 ชนิด ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากพืชมีเพียง 25 ชนิด (Linton และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต พอลิแซ็กคาไรด์ ได้และ มีข้อได้เปรียบ คือ สามารถ ผลิตได้รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย สามาถควบคุมภาวะการผลิตได้ และยังสามารถผลิตได้ ในปริมาณ มาก (Whistler, 1993)

มีรายงานถึงพอลิแซ็ คคาไรด์ที่ผลิตโดย แบคทีเรีย ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แซนแทน จาก *Xanthomonas campestris* อะซิแทน จาก *Acetobacter xylinum* เจลแลน จาก *Sphingomonas paucimovilis* และเดกซ์แทรน จาก *Leuconostoc mesenteroides* (Madiedo และ Gavilan, 2005) พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มีทั้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างและปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์เป็นชนิดที่สร้างขึ้นเพื่อโครงสร้างที่ใช้ ห่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า แคปซูล หรือบางชนิดที่สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ละลายอยู่ในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลชีพนั้นๆ เรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ หรือ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จึงมีการนำเชื้อเหล่านี้มาใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพราะง่ายต่อการสกัดและแยกออกจากผนังเซลล์ เมื่อเทียบกับชนิดที่สร้างและเก็บไว้ภายในเซลล์ (Paul, 1979)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต สามารถผลิตโดยจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย หรือรา โดย จะผลิตออกมานอกเซลล์ โดยมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่หลากหลายมาก สามารถแบ่งได้เป็น ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีความแตกต่างกันที่จำนวนขององค์ประกอบของสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ (Mata และคณะ, 2008) มีการใช้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรียอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม

ต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรม อาหาร ยา ผลิตภัณฑ์เคมี และ ทางสิ่งแวดล้อม อย่างเช่น ในการกำจัดโลหะหนัก เป็นต้น (Wang และคณะ, 2008) และ ในการบำบัดน้ำเสีย โดยพบว่ามีความปลอดภัย มีการออกฤทธิ์ที่ ดี อีกทั้งตัวพอลิเมอร์เอง สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (Jie และ คณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถในการต้านมะเร็ง (anti-tumor) ต้านไวรัส (anti-viral) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และชักนำให้เกิดอินเตอร์ฟีรอน (interferon) (El-Tayeb และ Khodair, 2007) ของพอลิเมอร์บางชนิด

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ สามารถ ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากมีสมบัติทางเคมี และทางกายภาพที่คล้ายกับพืชและสาหร่าย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียนั้นจะใช้เพื่อเพิ่มคุณลักษณะต่างๆ ให้กับผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สารให้ความข้นหนืด สารให้ความคงตัว สารอิมัลชั่น สารก่อเจล ซึ่งมีบทบาทในการก่อให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของไหล และ เพิ่ มเนื้อสัมผัสของอาหาร รวมทั้งรูปลักษณ์ที่น่ารับประทาน ตัวอย่างเช่น แซนแทน เจลแลน เป็นต้น (Madiedo และ Gavilan, 2005)

ในปัจจุบัน มีความสนใจ เพิ่มมากขึ้นสำหรับ พอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตโดย จุลินทรีย์ โดยมีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิต พอลิแซ็กคาไรด์ได้และมีความ หลากหลาย ในองค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างขึ้น ลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถ ใช้งานพอลิเมอร์ที่ได้ในด้านต่างๆ ที่สนใจโดยขึ้นกับลักษณะ วัตถุประสงค์ที่จะใช้ โดยไม่จำเพาะเจาะจงต่อลักษณะเด่นลักษณะใดลักษณะหนึ่งโดยขึ้นกับ ส่วนประกอบ เคมีและ สมบัติ ทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิด (El-Tayeb และ Khodair, 2007)

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์อยู่อย่างหลากหลายส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายจากจุลินทรีย์เหล่านี้ พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียเหล่านี้มี ลักษณะและการทำงานที่สามารถใช้แทนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากพืชและสาหร่ายทะเลได้ ทั้งนี้ความหลากหลาย ความคุ้มทุน ความสะดวก ความปลอดภัยทั้งต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมทำให้พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่เป็นที่สนใจทางอุตสาหกรรมและการค้า อีกทั้งการที่พอลิเมอร์เหล่านี้ที่มีความคงตัว และมีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ การผลิต หรือแม้กระทั่ง ภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี แต่ก็ยัง สามารถย่อยได้โดยธรรมชาติ ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ สาเหตุต่างๆเหล่านี้ทำให้ มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียขึ้นในระดับอุตสาหกรรม (Bueno และ Cruz, 2006)

สำหรับประเทศไทยแล้ว พอลิเมอร์ที่ใช้กันอยู่ยังต้องอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สูญเสียรายได้จากการนำเข้าสารเหล่านี้ การผลิตขึ้นเองเพื่อใช้งานในด้านต่างๆ ย่อมเป็นการลด

ค่าใช้จ่ายและเป็นการพึ่งพาตนเองได้ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ดำเนินการวิจัยในเรื่องนี้มาระดับหนึ่ง โดยได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต พอลิเมอร์ของแบคทีเรียเหล่านี้ ปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการกลายพันธุ์ให้ได้ผลผลิตที่สูง แต่งานทั้งหมดนั้นดำเนินการในระดับขวดเขย่า สำหรับงานวิจัยนี้ได้พัฒนาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขยายส่วน โดยการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับถังหมัก แล้วศึกษาสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากถังหมัก เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม ในระดับขวดเขย่า ศึกษาภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

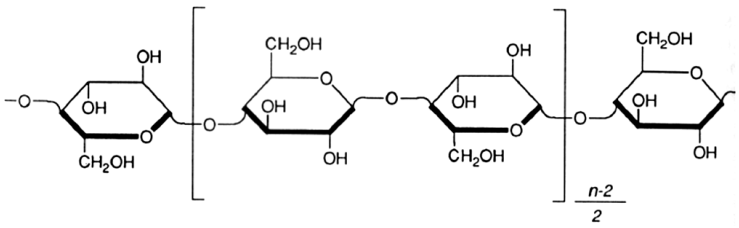
งานวิจัยนี้ทำให้ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักแบบแบตช์ และทราบสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางการผลิตและประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

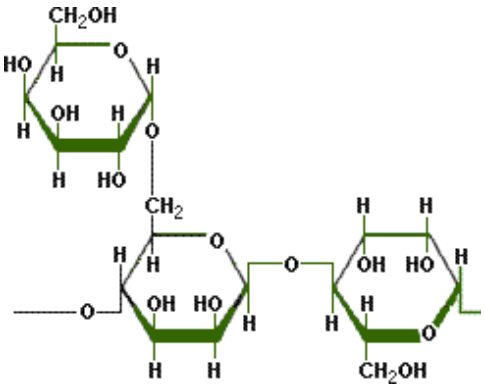
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 **พอลิแซ็กคาไรด์** (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่หรือแมโครโมเลกุล (macromolecule) ที่พบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดในธรรมชาติ เช่น พืช (ส่วนต้น ใบ ผล รากใต้ดิน) สาหร่ายทะเล และจุลินทรีย์ เป็นต้น บางชนิดมีหน้าที่เป็นอาหารสำรองของพืช เช่น สตาร์ช (starch) บางชนิดทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างเช่น เซลลูโลส (cellulose) เพกทิน (pectin) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และบางชนิดมีหน้าที่เกี่ยวกับการทำให้น้ำคงตัว (water stabilization) ในพืช ได้แก่ กัม (gums) ต่างๆ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (Whistler และ Miller, 1993)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (ก) เซลลูโลสในพืช, (ข) กัวกัมจากพืช

ที่มา : Whistler และ Miller (1993)

พอลิแซ็กคาไรด์ประกอบขึ้นจากหลายๆมอนอแซ็กคาไรด์จับต่อเนื่องกันเป็นสายโซ่ยาว การต่อกันระหว่างมอนอแซ็กคาไรด์เกิดจากหมู่เฮมิแอซีทัลไฮดรอกซีอิสระของมอนอแซ็กคาไรด์หน่วยแรกจับกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของมอนอแซ็กคาไรด์อีกหน่วยหนึ่ง แล้วสูญเสียน้ำออกไปหนึ่งโมเลกุล พันธะที่เกิดระหว่างมอนอแซ็กคาไรด์สองตัวเป็นพันธะไกลโคซิดิก พอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดในธรรมชาติจะมีจำนวนมอนอแซ็กคาไรด์สูงในช่วงหลักร้อยถึง 10^6 หน่วยของมอนอแซ็กคาไรด์ และมีความแตกต่างจากพวกมอนอแซ็กคาไรด์อิสระธรรมดาเช่น น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลกลูโคส คือไม่มีรสหวาน โดยสามารถจำแนกพอลิแซ็กคาไรด์ ตามชนิดของมอโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ ได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ (Nelson และคณะ, 2000)

1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียว ตัวอย่าง เช่น พูลลูแลน (pullulan) เดกซ์แท รน (dextran) เซลลูโลส (cellulose) มิวแทน (mutan) อัลเทอร์แนน (alternan) ลีแวน (levan) เคอร์ดแลน (curdlan) และสเครอโรกลูแคน (scleroglucan) เป็นต้น (Laws และคณะ, 2001)

2. เฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharides) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น แซนแทน (xanthan) ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสและแมนโนส เจลแลน (gellan) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส แรมโนส และกลูคิวโรนิกแอซิด (Laws และคณะ, 2001) และอัลจิเนต (alginate) ประกอบด้วย แมนนูโรเนท แอซิด และกลูรูโรเนท แอซิด เป็นต้น (Sutherland, 1990)

พอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งแบ่งประเภทไว้ดังข้างต้นนั้น ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ทั้งพืช สาหร่ายและจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 พอลิแซ็กคาไรด์จากพืช สาหร่าย และจุลินทรีย์ (Baird และPettitt, 1991)

Algal	Botanical	Microbial
Agar, algin, Carrageenan, Furcellaran	Guar gum, Gum Arabic, Gum ghatti, Gum tragacanth, Karaya gum, Locust bean gum, Pectin	Dextran, Xanthan gum, Gellan gum, Curdlan, Pullulan

นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำ และในธรรมชาติอาจจะมีประจุไฟฟ้า หรือไม่มีประจุไฟฟ้า (Kumar และคณะ, 2004) โดยสามารถจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ออกตามลักษณะประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 3 ชนิด คือ (Margaritis และ Pace, 1985)

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (Anionic polysaccharides) หรือบางครั้งเรียกว่า Acidic polysaccharides เช่น xanthan ที่มีหมู่อะเซทิล (Acetyl) กับ ไพรูเวท (Pyruvate) อยู่บนโมเลกุล ตัวอย่าง จุลินทรีย์ที่ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* (Kang และคณะ, 1983) *Pseudomonas* sp. (Williams และ Winpenny, 1977) *Arthrobacter viscosus* (Sloneker และคณะ, 1968) *Pestalotiopsis* sp.(Kwon และคณะ, 1996) *Bacillus* sp.(Suh และคณะ, 1997) *Enterobacter* sp. (Yokoi และคณะ, 1997) และ *Zoogloea ramigera* (Suh และคณะ, 1997) เป็นต้น

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (Neutral polysaccharides) เช่น ลีแวน (Levan) พูลลูแลน (Pullulan) เดกซ์แทรน (Dextran) และสเครอโรกลูแคน (Scleroglucan) เป็นต้น ตัวอย่าง จุลินทรีย์ที่ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง ได้แก่ *Enterobacter aggromerans* (Yoo และ Chnng, 1989; Yoo และคณะ, 1989) *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* สายพันธุ์ LBB.B332 (Sanchez-Medina และคณะ, 2007) เป็นต้น

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุบวก (Cationic polysaccharides) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ พวกที่มีหมู่ NH_3 หรือมีหมู่ของกรดอะมิโนบางตัวต่ออยู่ เช่น พอลิเมอร์ที่เป็นพอลิกลูตาเมต (polyglutamate) ตัวอย่าง จุลินทรีย์ที่ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุ บวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Ashiuchi และคณะ, 2001) และ *Bacillus licheniformis* (Hoppensack และคณะ, 2003)

Ganesh Kumar และคณะ (2004) รายงานว่า *Bacillus* sp. I-450 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนมลพิษสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีประจุเป็นกลาง (neutral sugars) คือ กาแลกโทส ฟรักโทส กลูโคส และแรฟฟิโนส น้ำตาลที่มี หมู่อะมิโน (amino sugars) และกรดยูโรนิก (uronic acids) ในอัตราส่วน 52.4 % 2.4 % และ17.2 % ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุล 2.2 X 10^6 ดาลตัน

Prasertsan และคณะ (2006) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* WD7เป็นเฮเทอโรพอลิ แซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วย น้ำตาลที่มีประจุเป็นกลาง (neutral sugars) 29.4% กรดยูโรนิก (uronic acids) 14.2% และน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน (amino sugars) 0.93 %

Jia และคณะ (2007) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Nostoc flagelliforme* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีประจุเป็นกลาง 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (43.2%) ไซโลส (20.6%) กาแลกโทส (29.9%) และแมนโนส (6.3%) มีน้ำหนักโมเลกุล 2.79 X 10^5ดาลตัน และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ไม่มีหมู่ซัลเฟต กรดนิวคลีอิก และโปรตีนเป็นองค์ประกอบ

Mata และค ณะ (2007) รายงานว่า แบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง (moderately halophilic bacteria) ที่จัดอยู่ในวงศ์ Alteromonadaceae 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Idiomarina fontislapidosi* F32^T *Idiomarina ramblicola* R22^T และ *Alteromonas hispanica* F23^T สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดย *Idiomarina* sp. ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และกาแลกโทส ส่วน *A. hispanica* F23^T ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วยน้ำ ตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และไซโลส

Wang และคณะ (2010) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ KF5 ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส กลูโคส และกาแลกโทส เป็นองค์ประกอบด้วยอัตราส่วน 1:4.99:6.90 ตามลำดับ และพบว่า โค รงสร้างประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) และเอไมด์ (amide group)

Torres และคณะ (2011) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ A47 ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีประจุเป็นลบ ได้แก่ ฟูโคส (26%) กาแลกโทส (28.9%) และกลูโคส (43.7%) เป็นองค์ประกอบ มีน้ำหนักโมเลกุล 8 X 10^5 ถึง 5 X 10^6 ดาลตัน

2.2 **พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์** (Microbial polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย และรา ได้แก่ แซนแทน จาก *Xanthomonas campestris* อะซิแทน จาก *Acetobacter xylinum* เจลแลน จาก *Sphingomonas paucimovilis* และเดกซ์แทรน จาก *Leuconostoc mesenteroides* (Madiedo และ Gavilan, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 อีกทั้งการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ยังมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยควบคุมภาวะที่ใช้ในการหมัก และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็นจำนวนมาก ส่วนการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งๆ มักจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ทำให้ต้องมีขั้นตอนในการแยกพอลิแซ็กคาไรด์ตัวที่ต้องการออกมา ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง (Whistler, 1993)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะให้การสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป สามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิด (Paul, 1979) คือ

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะสร้างอยู่ภายในเซลล์ บางส่วนจะรวมเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) และทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารจำพวกคาร์บอนหรือแหล่งส ะสมพลังงานของเซลล์

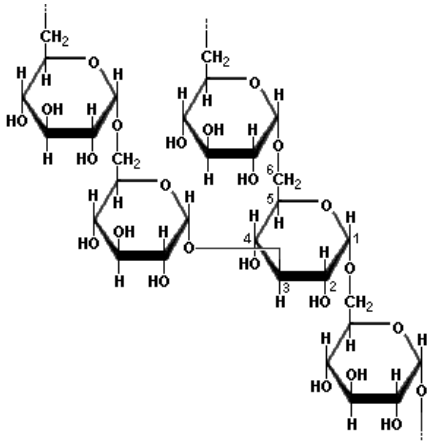
2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง (structural polysaccharide) เป็นองค์ประกอบที่แทรกอยู่ในผนังเซลล์และในบางกรณีอาจรวมตัวกับส่วนประกอบอื่น เช่น รวมกับลิพิดเป็นไกลโคลิพิด และรวมกับพอลิเพปไทด์เป็นเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan)

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้สร้างขึ้นเพื่อเป็นโครงสร้างที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า แคปซูล (capsule) มีลักษณะเป็นสารเหนียวคล้ายเจลเคลือบหรือปกคลุมเซลล์ มักทำให้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นเมือกเยิ้ม (mucoid) หรือเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะขึ้นมาจะยืดเป็นเส้นสาย (Robert, 1996) นิยมนำจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้มาใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพราะง่ายต่อการสกัด และแยกออกจากผนังเซลล์ (Paul, 1979)

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ (Kumar และคณะ, 2007)

จุลินทรีย์	พอลิแซ็กคาไรด์
Pseudomonas aeruginosa, *Azotobacter vinelandii*	อัลจิเนท (alginate)
Acinetobacter calcoaceticus	อิมัลแซน (emulsan)
Sphingomonas paucimobilis	เจลแลน (gellan)
Streptococcus equii, *Streptococcus zooepidemicus*	ไฮยาลูโรนิค แอซิด (hyaluronic acid)
Xanthomonas campestris	แซนแทน (xanthan)
Acetobacter spp.	เซลลูโลส (cellulose)
Rhizobium meliloti, *Agrobacterium radiobacter*	เคอร์ดแลน (curdlan)
Alcaligenes faecalis var. *myxogenes*	ซัคซิโนไกลแคน (succinoglycan)
Leuconostoc mesenteriodes	เดกซ์แทรน (dextran)

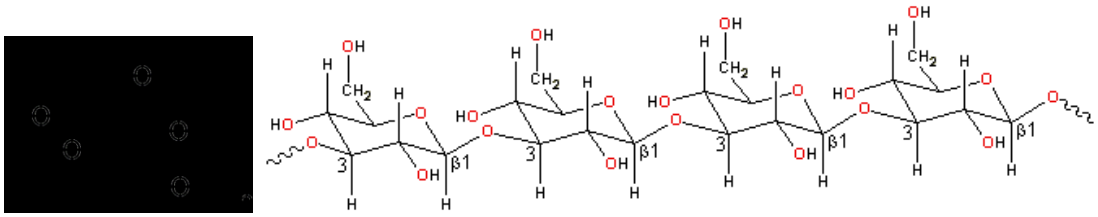
เดกซ์แทรน (Dextran) เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ชนิดที่ผลิตและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide) (Broadbent และคณะ, 2003) ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ที่ได้จากการสลายของซูโครสมาจับกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) หรือที่เรียกว่า กลูแคน (glucan) โดยพันธะนี้จะเป็นชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ และยังประกอบด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,2 α-1,3 และ α-1,4 เป็นส่วนของกิ่งสาขาอีกด้วย (Park และคณะ, 2001) ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเดกซ์แทรน

ที่มา : Pharmacosmos (2006)

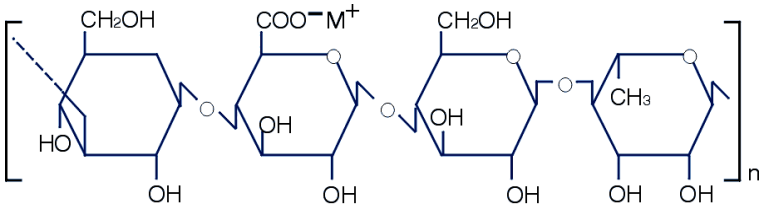
เคอร์ดแลน (Curdlan) หรือ β-1,3-glucan เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส 1,3-β-D-glucan ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งไม่ละลายน้ำ โดยประกอบด้วย β-(1,3) เชื่อมกับกลูโคสที่เหลือ โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.3 และมีประจุเป็นกลาง สามารถรวมตัวเป็นเป็นเจลที่ยืดหยุ่นได้เป็นสารแขวนลอยกับน้ำเมื่อโดนความร้อน ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes Agrobacterium* sp. และ *Rhizobium* sp. (Sutherland, 1990)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของเคอร์ดแลน

ที่มา : Chaplin (2008)

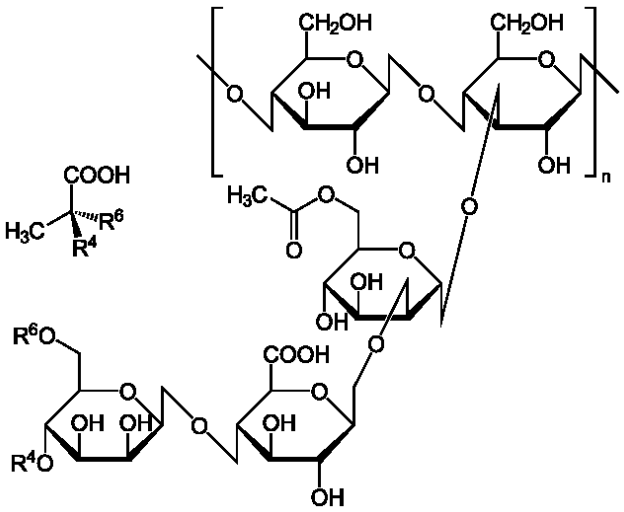
เจลแลน (gellan) เป็นเฮทเทอโร พอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีเส้นตรง เป็นหน่วยเตตระแซ็กคาไรด์ชนิดที่ ผลิตและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide) โดย *Sphingomonas paucimobilis* (Kang และ Veeder, 1982 ; Martin และคณะ , 1996) ประกอบด้วยดี -กลูโคส (Glc), ดี-กลูคิวโรนิก แอซิด (Glc A) และที่เหลือเป็นแอล -แรมโนส (Rha) (Jansson และคณะ , 1983) ซึ่ง (1-3)-b-β-glucose,(1-4)-β-D-glucuronic acid, (1-4)-β-D-glucose และ (1-4)-a-L-rhamnose เป็น backbone (Noda และคณะ, 2008) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของเจลแลน

ที่มา : Paradise (2007)

แซนแทน (Xanthan gum) เป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharides) ซึ่งผลิตโด ย *Xanthomonas campestris* ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยเพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharide) ประกอบไปด้วย ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กลูคิวโรนิก แอซิด (D-glucuronic acid) ในอัตราส่วนทั้งหมด 2:2:1 แกนกลาง (backbone) ของสายพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยสองหน่วยของ β-D-glucose เชื่อมตรงตำแหน่ง 1 และ 4 สายด้านข้าง (side chain) ประกอบด้วยแมนโนส 2 หมู่ และกลูคิวโรนิก 1 หมู่ ดังนั้นทั้งสายจึงประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล 5 หน่วยซ้ำ สายข้างเชื่อมกับกลูโคสอื่นตำแหน่งที่ 3 ของแกนกลาง หน่วยของแมนโนสมีกลุ่ม pyruvic acid เชื่อมเป็น ketal ที่ตำแหน่ง 4 และ 6 หน่วยแมนโนสอื่นมีกลุ่ม acetyl ตำแหน่งที่ 6 โดยสายเหล่านี้จะอยู่ในรูป double helix ทำให้มีประสิทธิภาพสูงทางด้านความหนืด (Mandala และคณะ, 2004; Sutherland, 1990) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของแซนแทน

ที่มา : Zamora (2006)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ชนิดของจุลินทรีย์และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิตามินและแร่ธาตุ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ค่าความเป็นกรดเบส และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น

2.3.1 ชนิดของจุลินทรีย์

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ มีหลักเกณฑ์ดังนี้ คือ เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงในเวลาสั้น ยีนส์ที่ควบคุมการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีความเสถียรหรือให้ผลผลิตสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดโดยเ ฉพาะแหล่งคาร์บอนราคาถูก ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้ดี และให้ผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณต่ำ (Asai, 1968)

2.3.2 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ โดยเป็นแหล่งพลังงาน และเป็นองค์ประกอบหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรักโทส กาแลกโทส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น แลกโทส มอลโทส และซูโครส น้ำตาลเชิงซ้อน เช่น แป้ง และแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เป็นต้น (Masaoka และคณะ, 1993)

Celik และคณะ (2008) รายงานว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* G1 และ *Pseudomonas putida* G12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส แมนโนส ฟรักโทส และไซโล ส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของไซโลสตั้งแต่ 2 – 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าสายพันธุ์ G1 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 368 มิลลิกรั มต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลส ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่สายพันธุ์ G12 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 262 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลส ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.3.3 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

เซลล์แบคทีเรียมีองค์ประกอบของไนโตรเจนประมาณ 8 - 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส และออกซิเจน เป็นต้น โดยสารอาหารไนโตรเจนสำคัญ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ถ้าปริมาณของไนโตรเจนในอาหารมากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (BeMiller and Whistler, 1996) แหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ ประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแ อมโมเนียมคลอไรด์ เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น beef extract, yeast extract, peptone, tryptone, soybean hydrolysate, soytone, casamino acid และ corn steep liquor เป็นต้น

Behravan และคณะ (2003) รายงานว่า กากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาล และสารสกัดจากรำข้าวสาลี (wheat bran extract) สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกและหาได้ทั่วไปในท้องถิ่น โดยทดลองแปรผันความเข้มข้นเพื่อหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ NRRL B-512 รวมทั้งทดลองแปรผันค่าความเป็นกรด- เบส พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลและรำข้าวสาลีที่เหมาะสมคือ 20% และ 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม คือ 7.5 โดยสามารถผลิตได้เดกซ์แทรนได้ 9.44 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของซูโครส

Banik และคณะ (2007) รายงานว่า องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 เพื่อผลิตเจลแลน ประกอบด้วย กากน้ำตาล ทริปโทน casamino acid ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต และแมงกานีสคลอไรด์ ปริมาณ 112.5 1.0 1.0 1.0 และ 0.947 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสามารถผลิตเจลแลนได้ถึง 13.814 กรัมต่อลิตร

2.3.4 อุณหภูมิ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสูงขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณมาก และที่อุณหภูมิต่ำ (Sutherland, 1977; Souw and Demain, 1979; Shu and Yang, 1990) อย่างไรก็ตาม สำหรับแบคทีเรียบางชนิด ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละสายพันธุ์อาจแตกต่างกันไป บางสายพันธุ์อาจจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ดีที่ภาวะที่ไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น ภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนน้อยและจำกัด ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลสูง (Sutherland, 1979; Cerning, 1990) หรือเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญ (Cerning, 1992)

ผลของภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบ คทีเรียแต่ละชนิด แตกต่างกันไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลไกการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อแตกต่างกัน เช่น หากการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เกิดควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ (growth-assosiated) ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อให้ได้ปริมาณมาก ควรจะเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการที่จะทำให้ช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นไปได้นาน ในขณะที่เชื้อมีอัตราการผลิต พอลิแซ็กคาไรด์สูง (Andaloussi และคณะ, 1995)

2.3.5 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น (pH)

ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่ต้องมีการควบคุมก่อน การหมัก เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมสำ หรับการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเบสเป็นกลาง (Roseiro, 1992)

Kim และคณะ (2003) รายงานว่า ความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิ ในการเลี้ยง *Leuconostoc mesenteroides* มีผลต่อการผลิตเดกซ์แทรนขนาดโมเลกุลต่างๆ และการเกิดกิ่งสาขาของเดกซ์แทรน โดยพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสจะส่งผลให้มีการผลิตเดกซ์แทรนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง และเกิดการสร้างกิ่งสาขาเพิ่มขึ้น สำหรับผลของอุณหภูมิในช่วงทดลอง (4-45 องศาเซลเซียส) พบว่าไม่มีผลต่ อขนาดโมเลกุลของ เดกซ์

แทรนมากนัก แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลต่อการเกิดกิ่งสาขาเพิ่มมา กขึ้น นอกจากนี้การปรับค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 4.5-6.0 จะไม่มีผลทั้งขนาดโมเลกุลและการเกิดกิ่งสาขาของเดกซ์แทรน โดยการควบคุมการผลิตเดกซ์แทรนให้มีลักษณะที่แตกต่างกัน จะเป็นแนวทางสำคัญในการนำเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ มาใช้ประโยชน์

Bueno และ Garcia-Cruz (2006) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. และ *Arthrobacter* sp. จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ 3B 4B 7B 21B 18E และ 21D ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่ าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ และจากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด เบสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด เบสเริ่มต้นในอ าหารเลี้ยงเชื้อจาก 5.0 เป็น 7.0 แต่ที่ค่าความเป็นกรด เบส 8.0 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าลดลง

Ayala-Hernandez และคณะ (2008) รายงานว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (JFR1) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 5.5 มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเบส 6.5

2.3.6 การให้อากาศหรือการกวน

การเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลิน ทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแท บอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอย สามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ซึ่งออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลา โดยการถ่ายเทจากอากาศ ซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญได้ด้วยความหนาแน่นสูงภายใต้ภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นในขั้นตอนกระบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา การมีออกซิเจนเพียงพอที่จะนำไปใช้ได้โดยควบคุมการให้อากาศ และความเร็วในการกวนสามารถรักษาปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ได้ไม่น้อยกว่า 30% (ในกรณีทีมีอยู่ 60%) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ (McNeely, 1967)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่างๆ ในอุตสาหกรรม (Monica, 2003)

พอลิแซ็กคาไรด์	**ระบบการเลี้ยงเชื้อ**	**ภาวะเลี้ยงเชื้อ**	**อาหารเลี้ยงเชื้อ**
แอลจิเนต	แบบต่อเนื่อง	- อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส - ค่าความเป็นกรดเบส 7.2 - ให้อากาศแก่ระบบ (ออกซิเจนในปริมาณที่มากเกินพอ ไม่กระตุ้นการสังเคราะห์ EPS)	- ซูโครส (20 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน - การผลิต EPS สูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อจำกัดปริมาณโมลิบดีนัม (molybdenum) และฟอสฟอรัสในระบบ
เดกซ์แทรน	แบบแบตช์	- อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส - ค่าความเป็นกรดเบส 6.0 - ไม่มีการให้อากาศในช่วงกระตุ้นการผลิต EPS	- ซูโครส (5-10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน - ไนโตรเจนและแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณมากจะกระตุ้นการสังเคราะห์ EPS
แซนแทนกัม	แบบแบตช์หรือแบบต่อเนื่อง	- อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส - ค่าความเป็นกรดเบส 7.0 - ให้อากาศแก่ระบบ (0.5 - 0.75 ลิตรต่อนาทีในช่วงแรก จากนั้น 0.75 - 1.5 ลิตรต่อนาทีในช่วงที่ความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น)	- กลูโคส (2 – 3.5 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน - มีไนโตรเจน ซัลเฟอร์หรือฟอสฟอรัสในปริมาณที่จำกัด

2.4 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขยายส่วน

การศึกษาทดลองภายในห้องปฏิบัติการนั้น โดยทั่วไปนิยมเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระดับขวดเขย่า เนื่องจากสามารถทำเป็นจำนวนมากหลายๆการทดลองได้ ไม่ยุ่งยาก และมีโอกาสปนเปื้อนน้อย จึงช่วยให้สามารถศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับเมแทบิลิซึม ผลของอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ การเติมสารชนิดต่างๆ และการปรับความเป็นกรดเบส ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นก่อนที่จะพัฒนากระบวนการหมักไปจนถึงระดับอุตสาหกรรมได้ จะต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆเหล่านี้ในถังหมักขนาดเล็กระดับห้องปฏิบัติการก่อน เนื่องจากถังหมักระดับห้องปฏิบัติการนี้มีลักษณะคล้ายกับถังหมักที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพียงแต่มีขนาดเล็กกว่า จึงทำให้สามารถศึกษาปรับปรุงภาวะต่างๆให้เหมาะสมได้ โดยที่เสียค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก ก่อนที่จะขยายไปสู่การผลิตในระดับขยายส่วนและระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กระบวนการหมักแบบแบตช์

กระบวนการหมักแบบแบตช์ เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อกา รเจริญ และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้จะทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด และเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในระบบแล้วจะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆเพิ่มลงไปอีก เซลล์จะเจริญจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เป็นต้น จากการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์นี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ต่อไป

Lopes และ คณะ (2003) ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค คือ *Arthrobacter viscosus* ในถังหมัก โดยใช้ไซโลสเป็นแห ล่งคาร์บอน (25 กรัมต่อลิตร) มีการควบคุมค่าความเร็วรอบในการกวนของใบพัด (agitation speed) ที่ 800 รอบต่อนาที ภายใต้การควบคุมค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 สามารถให้ผลผลิตสูงสุด 10 กรัมต่อลิตร ในเวลา 14 วัน และให้สมบัติที่เหมือนแซนแทนกัม สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสากรรมอาหารได้

Castillo และ Uribelarrea (2004) ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *Klebsiella pneumoniae* K63 ในถังหมักแบบต่อเนื่อง (fed-batch culture) ภายใต้การควบคุมสารอาหาร การเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากกว่าปกติ และการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน สามารถให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 54.8 และ 47.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และได้เอ กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีทั้งคุณภาพ และมีปริมาณสูงในเวลาเดียวกัน

Bandaiphet และ Prasertsan (2006) ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *Enterobacter cloacae* WD7 ภายใต้การหมักแบบให้อากาศ พบว่า ผลผลิต มีปริมาณมากขึ้น เมื่อมีการเพิ่มค่าอัตราการให้อากาศ (aeration rate) และค่าความเร็วรอบในการกวนของใบพัด (agitation speed) ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

Prasertsan และคณะ (2008) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์จาก *E. cloacae* WD7 แบบต่อเนื่อง ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ได้ภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ใช้ 3 % ซูโคลสเป็นแหล่งคาร์บอน , 0.05 % yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน , 0.2 % KH_2PO_4, 0.05 % $MgSO_4.7H_2O$ และ0.01 % NaCl ภายใต้การควบคุมค่า ความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส ค่าอัตราการให้อากาศ (aeration rate) 2.0 vvm และค่าอัตราเร็วในการกวนของใบพัด (agitation speed) ที่ 200 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 7.28 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะมีการพัฒนาการผลิตในระดับที่สูงขึ้น คือ ในถังหมักขนาด 72 ลิตร ในขั้นต่อไ ป

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรดเบส	ความเร็วรอบในการให้อากาศ (รอบต่อนาที)	น้ำหนักผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	เวลาในการเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
Agrobacterium radiobacter	ซูโครส 2.62% (ในระบบถังหมัก)	KNO3 0.26%	30	6.24	250	2.26%	3 วัน	Triveni และคณะ (2001)
Sphingomonas paucimobilis สายพันธุ์ NK2000	กลูโคส 2%	peptone 0.05%	30	6.5-6.8	200	4.95	3 วัน	Jin และคณะ (2003)
Arthrobacter viscosus	ไซโลส 2.5% (ในระบบถังหมัก)	ยีสต์สกัด 2%	28	7	800	10	15 วัน	Lopez และคณะ(2003)
Enterobacter cloacae สายพันธุ์ WD7	ซูโครส 3% (ในระบบถังหมัก)	ยีสต์สกัด 0.05%	30	7	200	4.8	3 วัน	Prasertsan และคณะ (2008)

2.5 ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษและสี เป็นต้น (Vinarta และคณะ, 2007) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติจัดเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพซึ่งมีสมบัติทางกายภาพเฉพาะตัวและมีสมบัติการไหล (rheological properties) ที่ดี ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และเป็นสารที่สลายได้ง่าย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง (Ying และคณะ, 2006) สมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ ซึ่งประยุกต์ใช้ในการก่อสร้างคอนกรีตเพื่อป้องกันการแตกแยกของชั้นคอนกรีต (Anonymous, 1996) อุณหภูมิหลอมเหลว ทำให้ทราบความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมทริก (Thermogravimetric analysis; TGA) (Zohuriaan และ Shokrolahi, 2004) การละลายน้ำ เช่น แซนแทนเมื่อละลายน้ำจะมีความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ จึงมีลักษณะเป็นซูโดพลาสติก ใช้ในการประยุกต์ทางอุตสาหกรรมสี สารเคลือบผิว โดยหากเลือกตัวทำละลายที่ไม่ดี สารเคลือบผิวจะหลุดล่อนได้ง่าย (Rinaudo และ Milas, 1978) พอลิแซ็กคาไรด์ที่มี สมบัติด้านความหนืดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารและเครื่องสำอางค์ (Renaud และคณะ, 2005) การเป็น อิมัลซิไฟเออร์เป็นสมบัติที่สำคัญสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Kodali และคณะ, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีสมบัติเฉพาะตัวอื่นๆอีกขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์นั้นๆ ทำให้สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้เสถียร สารจับเกาะ สารก่อ เจล สารทำให้เลือดแข็งตัว สารหล่อลื่น สารขึ้นรูปฟิล์ม สารทำข้น และสารที่ให้แขวนลอย (Margaritis และ Pace, 1985) ในด้านการบำบัดน้ำเสีย พบว่า มีการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นตัวจับในการดึงเอาโลหะหนักออกจากน้ำเสีย (Ozdemir และคณะ, 2003) นอกจากนี้ พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์อีก เช่น ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด และมีสมบัติต้านมะเร็งได้ (Fan และคณะ, 2007)

2.5.1 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยมากจะใช้ชนิดที่สามารถละลายน้ำได้ และมีสมบัติเป็นสารจำพวกไฮโดรคอลลอยด์ สามารถดูดน้ำได้ดี เมื่อละลายในของเหลวจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของการไหล (rheological properties) ของน้ำที่มีอยู่ในอาหารเป็นผลให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากความสามารถของการทำข้นหนืด จากสมบัติเหล่านี้พอลิแซ็กคาไรด์จึงได้ถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ในแยม ซ๊อส น้ำเชื่อม หรือไส้ขนม (Sanford และ Baird, 1983) โยเกิร์ต นมเปรี้ยว เนยแข็ง ขนมหวาน (Velasco และคณะ, 2006) และก่อลักษณะเจลในเจลลี่ พาย ขนมต่างๆ นอกจากนี้ยังใช้ในการเคลือบลูกกวาด การทำไอศกรีม และน้ำสลัด (Sutherland, 1990) เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติที่หลากหลาย แสดงดังตารางที่ 2.5 จึงนิยมนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้มากมาย

ตารางที่ 2.5 สมบัติต่างๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

หน้าที่	**การประยุกต์ใช้ในอาหาร**
สารจับยึด	น้ำตาลโรยหน้าขนม (ไอซิ่ง)
สารเคลือบ	ลูกกวาด
อิมัลซิไฟเออร์	น้ำสลัด
สารห่อหุ้ม	ผงสารก่อรส
สารก่อฟิล์ม	ไส้สำหรับหุ้มห่อไส้กรอก
สารทำให้ใส (ตกตะกอนสารคอลลอยด์)	ไวน์ และเบียร์
สารก่อความเสถียรของฟอง	เบียร์
สารก่อเจล	ลูกกวาด, เจลลี่, พาย และไส้ขนม
สารยับยั้งการเกิดผลึก	อาหารแช่แข็ง และน้ำเชื่อม
สารก่อความเสถียร	ไอศกรีม และน้ำสลัด
สารยับยั้งซินเนอเรซิส (syneresis)	เนยแข็ง และอาหารแช่แข็ง
สารเสริมการก่อเจล	เนื้อเจลสังเคราะห์ และอื่นๆ
สารทำข้น	แยม, ซ๊อส, น้ำเชื่อม และไส้พาย

ที่มา: Sutherland (1990)

Fodje และคณะ (2007) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Pediococcus damnosus* 2.6 มีลักษณะหนืดในสารละลาย มีสมบัติของการไหล ซึ่งเหมาะสมในการใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดในผลิตภัณฑ์อาหาร

Kodali และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* สายพันธุ์ RK-02 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโทส แมนโนส ฟูโคส กลูโคส และ กลูโคซามีน เป็นองค์ประกอบ และพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีกับน้ำมันพืชต่างๆ และสารพวกที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic substrates) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา

2.5.2 ด้านการแพทย์

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารที่ได้รับความสนใจทางด้านการแพทย์โดยมีความเกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการแพทย์ เช่น ทางเภสัชกรรม โดยการใช้เป็นตัวห่อหุ้มยาหรือเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยา และอาจใช้เพื่อตรึงเอนไซม์สำหรับการวินิจฉัยโรค หรือนำมาใช้สำหรับการปรับปรุงโดยวิธีการทางเคมี (chemical modification) ของผลิตภัณฑ์ยา สมบัติการไหล (rheology) และการก่อลักษณะเจล และสมบัติทางชีววิทยา (biological properties) เช่น สมบัติต้านมะเร็ง สมบัติต้านไวรัส และอาจใช้เป็นวัคซีนแทนการใช้เซลล์จุลินทรีย์เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงเนื่องจากองค์ประกอบอื่นๆ ของเซ ลล์เช่น โปรตีน เป็นต้น สมบัติ เหล่านี้ของพอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ (Sutherland,1990)

Liu และคณะ (2009) พบว่า แบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ EJS-3 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีแมนโนส ฟรักโทส และกลูโคสเป็นองค์ประกอบ มีสมบัติ ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งมีแนวโน้มที่ใช้นำไปใช้ในการรักษาบำบัดโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคสมองเสื่อม หรืออัลซ์ไฮเมอร์ (Alzheimer's disease) และความเสื่อมโทรมของเซลล์

Tong และคณะ (2009) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Pleurotus ostreatus* ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส กาแลคโทส กลูโคส สามารถละลายน้ำได้ มีสมบัติต้านเซลล์มะเร็งได้ดี จึงอาจนำไปพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งได้

2.5.3 ด้านการบำบัดน้ำเสีย

สารก่อการจับกลุ่ม (flocculants) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการของอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กระบวนการ downstream กระบวนการหมัก รวมถึงในการบำบัดน้ำเสีย (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) แม้ว่าสารก่อการจับกลุ่มที่สังเคราะห์ทางเคมีมีลักษณะเฉพาะตัว รวมทั้งมีประสิทธิภาพและราคาถูก แต่สารเหล่านี้ย่อยสลายยาก บางครั้งสารที่สังเคราะห์เป็นสารก่อการจับกลุ่มก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพและเพิ่มภาวะเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น polyacrylamide เป็นที่นิยมในการใช้เป็นสารก่อการจับกลุ่ม เกิดจากการรวมตัวของ acrylamide ซึ่งตรวจพบว่าเป็นพิษต่อประสาทและเป็นสารก่อ มะเร็งต่อมนุษย์ (Dearfield และ Abermathy, 1988; Yokoi และคณะ, 1997) ดังนั้นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ (Bioflocculants) จึงมีความสำคัญและน่าสนใจที่จะนำมาใช้แทนที่สารก่อการจับกลุ่มที่สังเคราะห์ทางเคมี (Jang และคณะ, 2001) เพราะย่อยสลายทางธรรมชาติได้ และมีความปลอดภัยต่อระบบนิเวศน์ (He และคณะ, 2004) พอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม จึงมีบทบาทสำคัญมากขึ้นโดยสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Alcaligenes cupidus* สายพันธุ์ KT-201(Toeda และ Kurane, 1991) *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ B-16 (Kurane และ Nohata, 1991) และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ DP-152 (Suh และคณะ, 1997)

สารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพทำให้เกิดการตกตะกอนของอนุภาคสารแขวนลอยโดยการสร้างสะพานเชื่อม (bridging) และการทำให้เกิดสภาพเป็นกลาง (charge neutralization) สารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพเหล่านี้จะมีการจับกลุ่มกันได้หนาแน่น ซึ่งต้องขึ้นกับไอออนบวกด้วย ตัวอย่างเช่น สารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ S11 ไม่สามารถจับกลุ่มได้ถ้าไม่มีการเติมสารละลาย $CaCl_2$ (Dermlim และคณะ, 1999) และสารก่อการจับกลุ่มที่ผลิตโดย *Enterobacter aerogenes* ต้องการ Zn^{2+} สำหรับการจับกลุ่ม (Lu และคณะ, 2005) บทบาทของ ไบเวเลนต์ และไทรเวเลนต์ แคตไอออน คือการเพิ่มการเกาะติดของพอลิเมอร์ทางชีวภาพบนอนุภาคสารแขวนลอยโดยการลดประจุลบบนพอลิเมอร์และอนุภาคสารแขวนลอย (Levin และ Friesen, 1987; Levy และ คณะ ,1992)

Yun และ Park (2003) รายงานว่า จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. CP912 พบว่ามีความสามารถในการก่ออิมัลชันระหว่างน้ำมันกับน้ำ และมีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มต่อแอคติเวตคาร์บอน (activated carbon) สูง

Prasertsan และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 สามารถผลิต เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีประจุลบ และมีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม ซึ่งมีกิจกรรมการก่อการจับกลุ่มสูงสุด (flocculating activity) ที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 40 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2$ ซึ่งมีบทบาทร่วมกันต่อการตกตะกอนของดินขาว (kaolin)

Freitas และคณะ (2011) ได้รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter* strain A47 DSM23139 มีสมบัติในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับอนุภาคดินได้ดี จึงสามารถประยุกต์ใช้ในด้านการบำบัดน้ำเสียได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ดูดซับโลหะหนักโดยพอลิแซ็กคาไรด์สามารถใช้แยกโลหะหนักจากน้ำเสีย ซึ่งเกิดปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกของโลหะหนักและประจุลบของพอลิแซ็กคาไรด์ (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2003)

จากการศึกษาของ Moon และคณะ (2006) พบว่า เพสแทน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตจากรา *Pestalotiopsis* sp. สายพันธุ์ KCTC 8637P มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม แล้วยังสามารถกำจัดโลหะหนักได้ซึ่งสามารถดูดซับตะกั่ว (Pb^{2+}) และ สังกะสี (Zn^{2+}) ในน้ำเสียสังเคราะห์ได้

Mokaddem และคณะ (2009) รายงานว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Paenibacillus polymyxa* สามารถดูดซับแคดเมียม (Cd^{2+}) จากสารละลายได้ ดังนั้นจึงอาจนำไปใช้เป็นตัวดูดซับโลหะหนักที่ผลิตง่าย ราคาไม่แพง และมีประสิทธิภาพ เพื่อกำจัดโลหะหนักจากน้ำเสีย

2.5.4 ด้านอุตสาหกรรมน้ำมัน

การขุดเจาะน้ำมันมีการพัฒนาการเจาะหลุมปิโตรเลียมจากแบบกระแทกมาเป็นแบบหมุน และอาศัยของไหลสำหรับการเจาะ (Drilling Fluid) หรือน้ำโคลนสำหรับการเจาะ (Drilling Mud) น้ำโคลนสำหรับการเจาะเป็นส่วนที่สำคัญมากอันหนึ่งของการทำงานในส่วนของงานการเจาะ มันเป็นตัวช่วยหล่อลื่ นให้กับหัวเจาะและช่วยนำพาเศษดิน เศษหินที่ถูกเจาะหรือถูกตัด (Drill Cuttings) ขึ้นมาสู่พื้นผิว (Chilingarian และ Vorabutr, 1983) น้ำโคลนหรือของไหลสำหรับการเจาะ โดยปกติแล้วจะมีสมบัติเป็นของไหลแบบซูโดพลาสติกและต้องเสถียรภายใต้แรงเฉือน (shear forces) และอุณหภูมิระหว่างกระบวนการขุดเจาะน้ำมัน ในการขุดเจาะน้ำมันนั้นพบว่าได้มีการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้เป็นของไหลหรือเป็นส่วนผสมในน้ำโคลนสำหรับการเจาะ (Sutherland,1990)

Paul และคณะ (1986) รายงานว่า PS-7 กัมเป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Azotobacter indicus* เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส แรมโนส กรดกลูคิว คิวโลนิก และหมู่ O-acetyl สามารถละลายน้ำได้และทำให้สารละลายมีความหนืดสูง มีสมบัติเป็นของไหลแบบซูโดพลาสติก ที่ดี มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ ในช่วง 4^0C – 93^0C มีความเสถียรและเข้ากันได้ดีกับสารละลายเกลือที่ความเข้มข้นสูงได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นของไหลสำหรับการเจาะ

2.5.5 ด้านอุตสาหกรรมการย้อมและการพิมพ์สิ่งทอ

สมบัติด้านการทำข้น (thickener) และความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์หรือสารทำใ ห้เสถียรของพอลิแซ็กคาไรด์ มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมสีย้อมและการพิมพ์สิ่งทอ โดยช่วยเพิ่มการแทรกซึมและการกระจายตัวของสีไปยังเส้ยใย เป็นตัวช่วยเพิ่มความคงทนต่อการจับเกาะของสีกับเส้นใยระหว่างกระบวนการอบแห้งหลังการพิมพ์ (Sutherland,1990)

อัลจิเนต เป็นสารทำข้นที่ดีสำหรับนำมาใช้ในการพิมพ์สิ่งทอเนื่องจากสมบัติด้านความข้นหนืด ในการควบคุมสมบัติการไหลของสีเพื่อความคมชัด และความสะอาดของลวดลายบนเนื้อผ้า โดยป้องกันการกระจัดกระจายของสีบนเนื้อผ้า (Fijan และคณะ, 2007)

Paul และคณะ (1986) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ PS-10 ที่ผลิตโดยแบคทีเรียจากดิน ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส กาแลคโทส แมนโนส ฟูโคส และกรดกลูคิวโลนิกเป็นองค์ประกอบ มีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้ในการพิมพ์พรม เนื่องจากมีความสามารถเข้ากันได้กับ สีเบสิก (basic or cationic dye) และสามารถทนได้ดีต่อเอนไซม์เซลลูเลสและเสถียรต่ออุณหภูมิ

2.5.6 ด้านเกษตรกรรม

พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติเป็นสารก่อฟิล์ม จึงสามารถนำมาใช้เป็นสารเคลือบผิว เคลือบเมล็ด และรากของพืช ป้องกันพืชจากความแห้งแล้งและสภาพแวดล้อมต่างๆได้ เพื่อรักษาอายุของผลผลิตทางการเกษตร ตัวอย่างเช่น การใช้อัลจิเนตเป็นสารเคลือบ (coating agent) ต้นอ่อนของพืช (Sutherland,1990)

Chenu (1993) ได้รายงานว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ จึงทำให้ดูดซับน้ำไว้ได้ดี มีประโย ชน์ในการเพิ่มการดูดซับน้ำของดินเหนียวและดินทรายสำหรับการเพาะปลูกพืชได้

2.6 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

2.6.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromato graphy)

เทคนิคแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ วิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ในการวิเคราะห์ทาง ด้านอาหาร และยา ทางด้านการแพทย์ และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์ สารปริมาณต่ำๆได้ในระดับไมโครกรัม (µg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยก

ออกมา สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับการดูดซับของสารประกอบนั้นกับเฟสอยู่กับที่ สารที่ดูดซับได้ต่ำกับเฟสอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง (Lindsay,1991) และผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) โดยระบบการแยก ในเทคนิค HPLC มี 2 แบบตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่คือ การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสคงที่แบบเดียวตลอดการแยก (Isocratic) และการแยกโดยมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสคงที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้น (Gradient elution) (Skoog, 1988)

2.6.2 เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis: TGA)

เทคนิควิเคราะห์สมบัติทางความร้อนโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารเมื่อได้รับความร้อนภายใต้บรรยากาศที่กำหนด เป็นเทคนิคที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะสมบัติของวัสดุต่าง ๆ เช่น พอลิเมอร์ สารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ เซรามิค โลหะ แก้ว และวัสดุทั่วไปอื่น ๆ การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน เป็นการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของวัสดุที่ขึ้นกับอุณหภูมิและเวลา ผลการวิเคราะห์จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับ สมบัติทางความร้อน ความเสถียรต่อความร้อน และลักษณะการผ่านกระบวนการทางความร้อนของวัสดุ โดยทำการศึกษาน้ำหนักที่หายไปเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความร้อนที่วัสดุดูดหรือคาย เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือเวลา และการเปลี่ยนแปลงขนาดของวัสดุ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับก๊าซ หรือระเหยของน้ำ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนเฟสหรือ การสลายตัวของวัสดุ (Decomposition) (Gooch, 1997)

หลักการทำงานของเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส คือ ใช้พื้นฐานการวัดน้ำหนักอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง (thermobalance) ในระหว่างการวิเคราะห์ อุณหภูมิของตัวอย่างซึ่งอยู่ในบรรยากาศปกติ หรือก๊าซเฉื่อยจะถูกทำให้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ข้อมูลการวิเคราะห์จะถูกบันทึกเป็นเทอร์โมแกรมที่แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวอย่าง และอุณหภูมิ (Hatakeyama และ Quinn, 1999)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME ของบริษัท Eyela, Japan
2. กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan
3. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX
5. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX
6. กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX
7. บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX
8. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX
9. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
10. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
11. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
12. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
13. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
14. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A3-S ของบริษัท Eyela, Japan

15. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota Corp., Tokyo, Japan
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น Spectrafuge ของบริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 ของบริษัท Hettich zentrifugen, Germany
19. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cuberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybermatics, Singapore
20. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, Inc., USA
21. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
22. เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer/hot plate) รุ่น 502P-2 ของบริษัท Mettler Toledo., USA
23. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scienctific, USA และ Sanyo Electric, Japan
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
26. ตู้แช่เย็น (freezer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo, Japan
27. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
28. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany
29. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE800 ของบริษัท Memmert, Germany

30. โถดูดความชื้น (desiccator)
31. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
32. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P20, P100, P200, P1000, P5000 และP10000 ของบริษัท Gilson, France
33. ปิเปตทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 ไมโคลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml ของบริษัท Axygen Scientific, USA
34. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 ของบริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong
35. เข็มฉีดสารตัวอย่าง ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น EXMSR 100 ของบริษัท ITO Corporation, Japan
36. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
37. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น 2000ES ขอบบริษัท Alltech, USA
38. คอลัมน์ Sugar SZ5532 ของบริษัท Shodex, Japan
39. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 ของบริษัท Eyela, Japan
40. เครื่อง Simultaneous thermal analyzer รุ่น 409 ของบริษัท Netzsch, Germany
41. เครื่อง Viscometer รุ่น LVDV III ของบริษัท Brookfield Engineering Laboratories, Inc., USA

3.2 **เคมีภัณฑ์**

1. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany
2. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
3. อะราบิโนส (arabinose) ของบริษัท Fluka, Switzerland
4. ฟรุกโทส (fructose) ของบริษัท Fluka, Switzerland
5. กาแลคโทส (galactose) ของบริษัท Difco, USA
6. แมนโนส (mannose) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA และของบริษัท Fluka, Switzerland

7. แรมโนส (rhamnose) ของบริษัท Difco, USA
8. ไรโบส (ribose) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA และของบริษัท Fluka, Switzerland
9. ไซโลส (xylose) ของบริษัท Difco, USA และของบริษัท Fluka, Switzerland
10. แลคโทส (lactose) ของบริษัท Merck, Germany
11. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ของบริษัท Merck, Germany
12. แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
13. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
15. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
16. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
17. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
18. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
19. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany
20. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
21. กรดซัลฟูริกเข้มเข้น (H_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
23. เมทานอล (methanol) ของบริษัท Merk, Germany
24. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
25. อะซีโตน (C_3H_6O) ของบริษัท Merk, Germany
26. เฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, USA
27. ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท Merk, Germany
28. ฟีนอลไนโตรพรัสไซด์ ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) ของบริษัท Fluka, Switzerland
29. คูแมสซีบลู (coomassie blue) ของบริษัท Fluka, Switzerland
30. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
31. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
32. คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
33. สารกำจัดฟอง (antifoam A) ของบริษัท Fluka, Switzerland

34. วุ้นผง (agar) ของบริษัท บิกเบน โปรดัคตอรา เดอ อะการ์ เอส.เอ., Chile
35. แซนแทนกัม ของบริษัท Success chemical, Thailand
36. คาราจีแนน ของบริษัท Success chemical, Thailand
37. กัวกัม ของบริษัท Success chemical, Thailand
38. ดินขาว (kaolin) ของบริษัท Mark, England
39. น้ำมันหล่อลื่น ของบริษัท เอ็มเอ็นออโต้ทีม, Thailand
40. น้ำมันดิบ (crude oil) ของสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด, Thailand
41. น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ของศูนย์เรียนรู้เครือข่ายกสิกรรมไร้สารพิษ, Thailand
42. น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ตราสวนมะพร้าวยายระเบียบ, Thailand
43. น้ำมันถั่วเหลือง ของบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด, Thailand
44. น้ำมันปาล์ม ขอบบริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด, Thailand
45. น้ำมันมะกอก ของบริษัท มิงกล กาเยโก เอส เอ, Spain

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์กลายจากแบคทีเรียตั้งต้น คือ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่คัดแยกได้จากอ้อย อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการชักนำใ ห้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี N-methyl-N-nitrosoguanidine (NTG) โดยณฤดี อัศวเสรีเลิศ (2552)

3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เขี่ยเชื้อ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) และเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์

3.3.2.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เขี่ยเชื้อ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998)(ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เ ท่ากับ 0.8 - 1.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น (ภาคผนวก ก) ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

3.3.3 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

3.3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อบริสุทธิ์ในข้อ 3.3.2.1 มาใช้เป็นหัวเชื้อโดยถ่ายแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็น กรด-เบสเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.3.2 การผลิต สกัดแยก และการทำพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำแบคทีเรียมาตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยถ่ายหัวเชื้อ ปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปรับค่าความเป็นกรด - เบสเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสที่แยกได้ไปเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน (Lin และChien, 2007) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนน้ำใสที่แยกได้ไปตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้เอทานอลเย็น ความเข้มข้น 95% โดยปริมาตรของเอทานอลที่ใช้เป็น 3 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใสที่นำมาตกตะกอน จากนั้นเขย่า และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ แยกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (Kumar และคณะ, 2004) ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่น จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นปริมาตรเป็น 3 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer) ทำให้น้ำหนักคงที่ในโถดูดความชื้น (desiccator) หาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ และรายงา นผลที่ได้ในหน่วยกรัมต่อลิตร เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

3.3.4 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ

3.3.4.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998)(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

550 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ วัดค่าความเป็นกรดเบส น้ำหนักเซลล์ แห้งตามข้อ 3.3.5.2 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.3 และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามข้อ 3.3.5.4

3.3.4.2 ศึกษาความเสถียรในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีดังข้อ 3.3.3.1 และ3.3.3.2 ในวันที่ 1 3 7 15 30 60 90 และ120 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4

3.3.5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า

3.3.5.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 โดยมีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลซูโครส และแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4 ปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 3.3.5.5 และปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.3.5.6

3.3.5.2 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็น เวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4 ปริมาณน้ำตาลรวม ตามข้อ 3.3.5.5 และปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.3.5.6 โดยแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจน ดังต่อไปนี้

- ภาวะ ที่มีแหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$
- ภาวะ ที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยี สต์ (Yeast extract)

3.3.5.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำเซลล์ไปอบในตู้อบความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำหนักคงที่ในโถดูดความชื้น (desiccator) แล้วนำไปชั่งเพื่อคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.5.4 การวิเคราะห์น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์

การผลิต สกัดแยก และทำพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีในข้อ 3.3.3.2 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปชั่งเพื่อคำนวณหาน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kemper (1974)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพรัสไซด์รีเอเจนท์ 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์รีเอเจนต์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.6 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก

3.3.6.1 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.2 โดยแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่

- ภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน
- ภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจน

โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็น เวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4 ปริมาณน้ำตาลรวม ตามข้อ 3.3.5.5 และปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.3.5.6

3.3.6.2 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998)(ภาคผนวก ก) ลงในถังหมักที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรข้างต้นที่มีการ แปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.6.1 โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร แปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4 และปริมาณน้ำตาลรวม ตามข้อ 3.3.5.5

3.3.6.3 ศึกษาอัตราเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998)(ภาคผนวก ก) ลงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยง เชื้อเหลวสูตรข้างต้นที่มีการปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.6.1 บรรจุอยู่ โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร แปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ600 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยเลือกอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.6.2 มาใช้ในการศึกษา โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4 และปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 3.3.5.5

3.3.6.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 3.3.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998)(ภาคผนวก ก) ลงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรข้างต้นที่มีการปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.6.1 บรรจุอยู่ โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร ใช้อัตราการให้อากาศ และ อัตราเร็วใบกวน ที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.6.2 และ 3.3.6.3 ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.3.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.3.5.4 และปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 3.3.5.5

3.3.6.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก

นำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และ ปริมาณน้ำตาลรวม จากการศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่าตามข้อ 3.3.5.1 และ3.3.5.2 และการผลิตในระดับถังหมักตามข้อ 3.3.6.1 3.3.6.2 3.3.6.3 และ3.3.6.4 มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย ดังนี้

- อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ)
- อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (specific consumption rate; γ)
- อัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate; ρ)
- ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$)
- ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$)
- ความสามารถในการผลิต (productivity)

3.3.7 **ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์**

3.3.7.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.1.1 ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยกรดซัลฟูริก

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย กรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ จากนั้นรอให้เย็นและปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และ1 โมลาร์ ตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน แล้วจึงนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยเก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส (วิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549)

3.3.7.1.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประ กอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ในการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซล เซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.3.7.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ปริมาณ 20–25 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Simultaneous Thermal Analyzer (STA) ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2004)

3.3.7.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ต่อระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้หรือเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการแปรผล ถ้าเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัด ของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงถึง ความสามารถในการอุ้มน้ำสูง โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น (Tako และคณะ, 1982)

3.3.7.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้ นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น จากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

3.3.7.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช (น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม สาร เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยอัตรา 200 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifing activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.6 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Cooper และGoldenberg, 1987)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์จากระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟ เออร์ และคำนวณหา ค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsification index (E_{24})) จากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\text{Emulsification index } (E_{24}) = \frac{\text{ระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟเออร์}}{\text{ระดับความสูงทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.7.7 การศึกษาความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์ (Kurane และคณะ, 1986)

นำสารละลายแขวนลอยดินขาว (Kaolin clay) ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมกับแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยมีการแปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5 10 15 20 25 30 35 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นทำการดูด ส่วนน้ำใสชั้นบน (upper phase) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) จากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\text{Flocculating activity} = 1/(A_{550}) - 1/(A_{550})^{C}$$

3.3.7.8 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ จะทำให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง

3.3.7.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โด ย วิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟม าตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.7.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie blue (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรี ยบเทียบ ค่าปริมาณโปรตีน กับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.7.10 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นนำมาวัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Viscometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mata และคณะ, 2008)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิต พอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

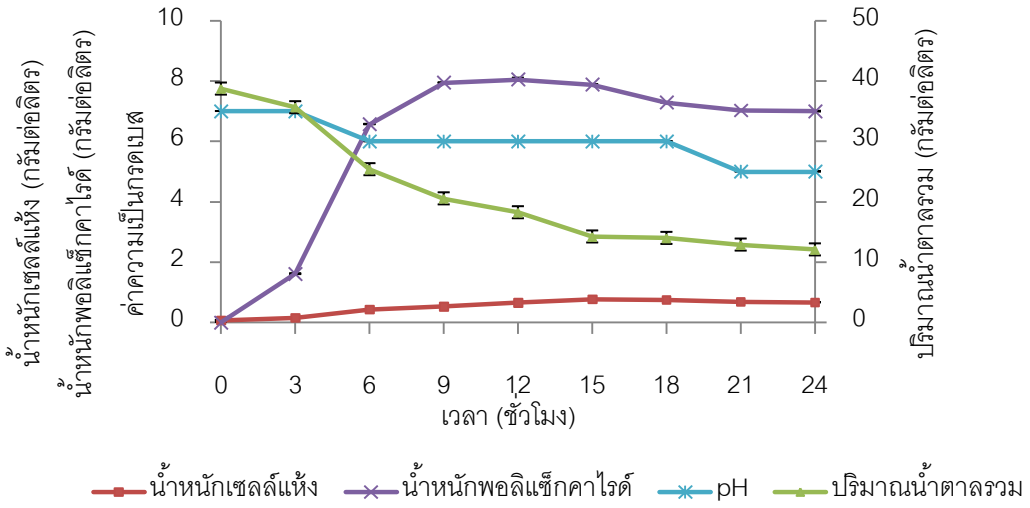
สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ได้ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย โดยคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ จากนั้นคัดกรองสายพันธุ์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูง ได้แก่ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และศึกษาการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ซูโครสความเข้มข้น 4.0% $(NH_4)_2SO_4$ความเข้มข้น 1.0% และยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิต พอลิแซ็กคาไรด์ได้ สูงสุดเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร และเมื่อศึกษา หาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ พบว่า มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 88.94 เปอร์เซนต์ และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.29 เปอร์เซนต์ เมื่อทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์บางส่วนและหาชนิดประจุ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีประจุลบ (acidic polysaccharide)

ต่อมางานวิจัยของ ณฤดี อัศวเสรีเลิศ (2552) ได้ศึกษา การปรับปรุงสายพันธุ์ จุลินทรีย์ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี N-methyl-N-nitrosoguanidine (NTG) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกลายพันธุ์ได้มาทั้งหมด 8 ชนิด เมื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์กลาย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด ใน ภาวะการเลี้ยงเชื้อระดับขวดเขย่า ที่มีค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยอัตราการบ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 18 ชั่วโมง สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 7.15 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหา อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า เพื่อนำ ภาวะที่เหมาะสมไป ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไร ด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

4.1.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็น เวลา 24 ชั่วโมงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และค่าความเป็นกรดเบส ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และค่าความเป็นกรดเบส ของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

จากภาพที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 ซึ่งเป็นระยะ log phase และมีเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อเป็น เวลา 15 ชั่วโมง ในส่วนของค่าความเป็นกรดเบสและปริมาณน้ำตาลรวม พบว่ามีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5และมีปริมาณน้ำตาลรวมคงเหลือเท่ากับ 12.067 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณารูปแบบของการ เจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามีการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (growth-

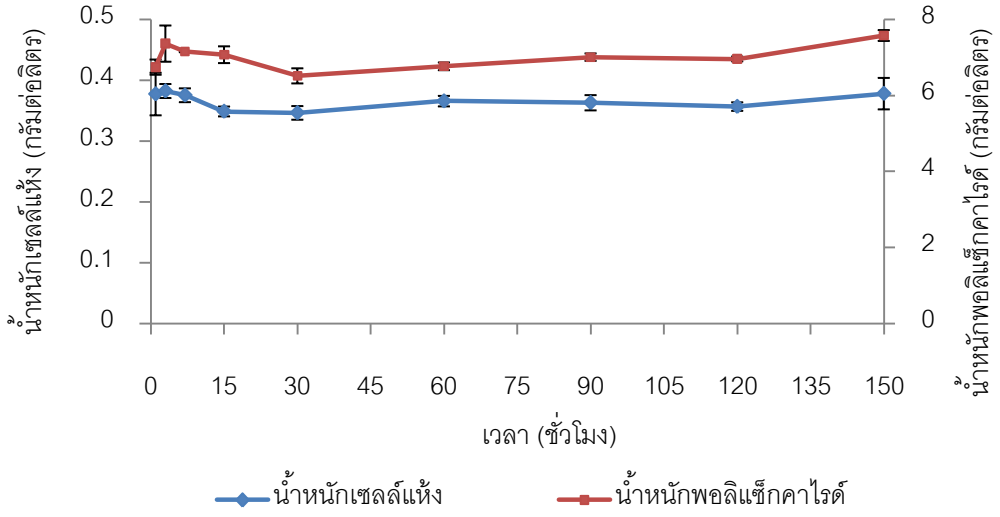
associated) โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 8.051 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จึงเป็นสารเมทาบอไลท์แบบปฐมภูมิ (primary metabolite)

4.1.2 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที วันที่ 1 3 7 15 30 60 90 120 และ150 นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในต ารางที่ 4.1 และในภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน

เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)
1	0.377±0.03	6.745±0.20
3	0.382±0.01	7.364±0.47
7	0.375±0.01	7.152±0.01
15	0.348±0.08	7.072±0.22
30	0.346±0.01	6.516±0.19
60	0.365±0.08	6.766±0.10
90	0.363±0.01	7.008±0.01
120	0.356±0.07	6.961±0.06
150	0.378±0.02	7.578±0.14



ภาพที่ 4.2 ความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน

จากตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 0.382 กรัมต่อลิตร และน้อยที่สุดเท่ากับ 0.346 ซึ่งเมื่อพิจาณาแล้ว พบว่ามีค่าต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งไม่เกิน 0.036 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 7.578 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตได้น้อยที่สุดเท่ากับ 6.516 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ค่าต่างไม่เกิน 1.062 กรัมต่อลิตร ดังนั้น ในช่วง เวลา 150 วันที่ทำการทดลองแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จึงมีความเสถียรของการเจิญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังแสดงในภาพที่ 4.2

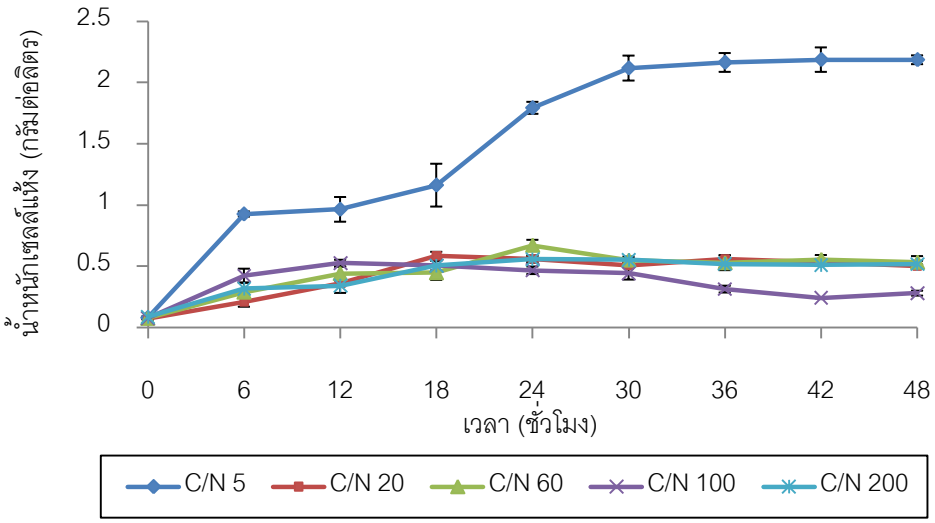
4.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า

4.2.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

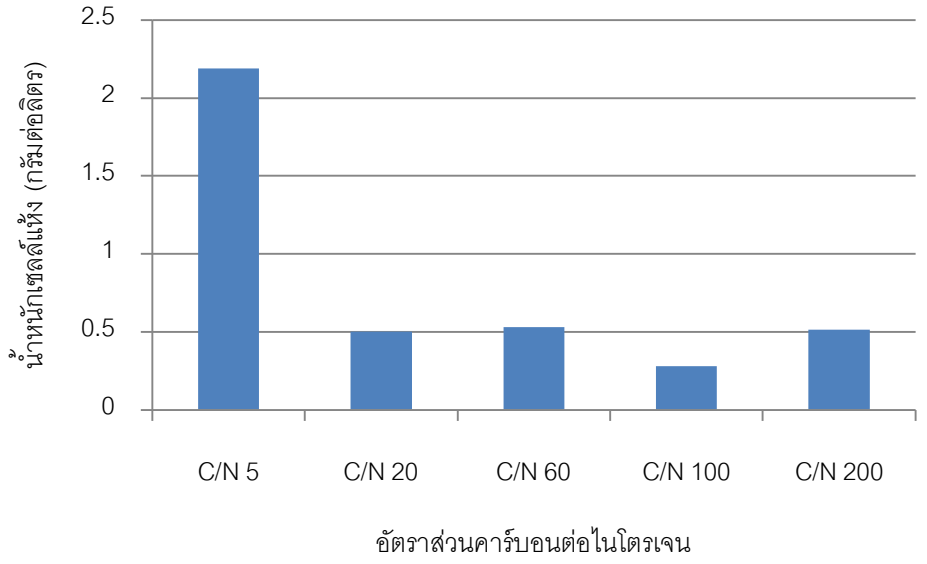
เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยมีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลซูโครส และแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็น เวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และปริมาณไนโตรเจน ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.3-4.8

ตารางที่ 4.2 ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อมีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน

อัตราส่วน C/N	ปริมาณคาร์บอน (น้ำตาลซูโครส, กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน	
		แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)
5	40	18.66	2
20	40	4.66	2
60	40	1.55	2
100	40	0.93	2
200	40	0.46	2

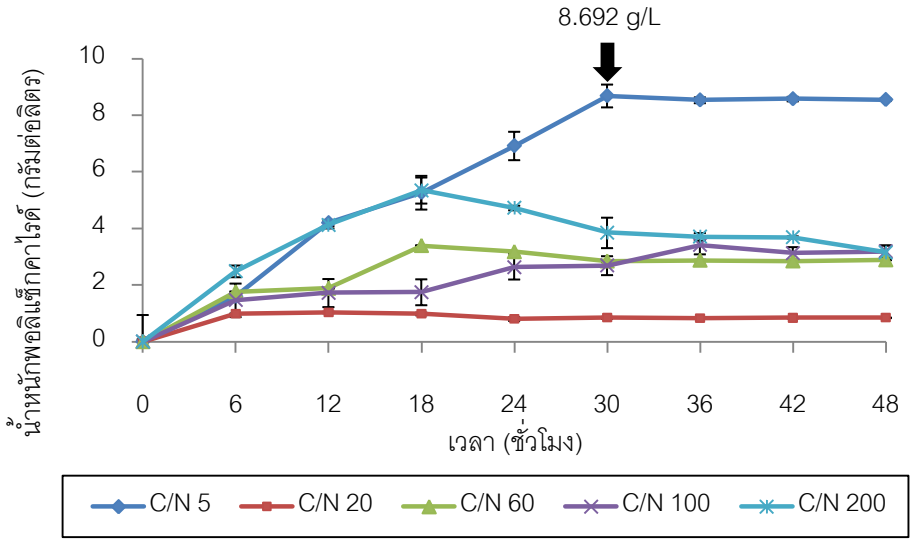


ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



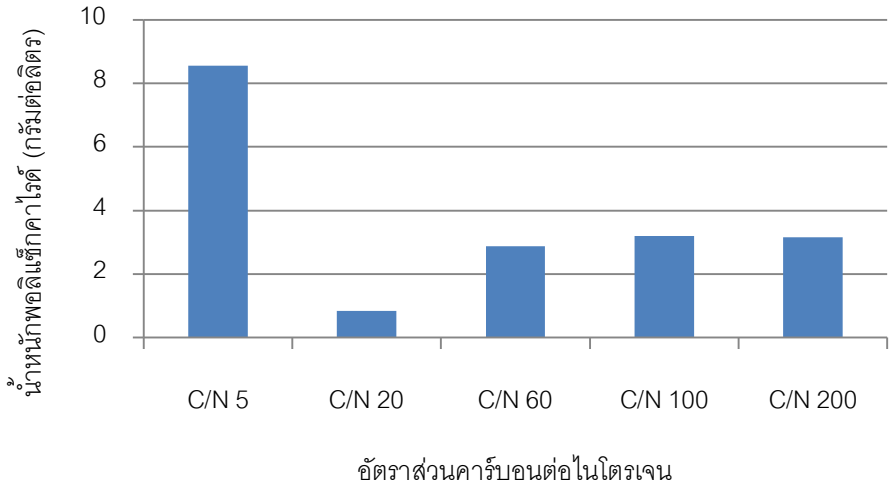
ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200

จากภาพที่ 4.3 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีแนวโน้มของการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.4) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีการเจริญสูงสุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.187 กรัมต่อลิตร และที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 มีการเจริญน้อยที่สุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.279 กรัมต่อลิตร

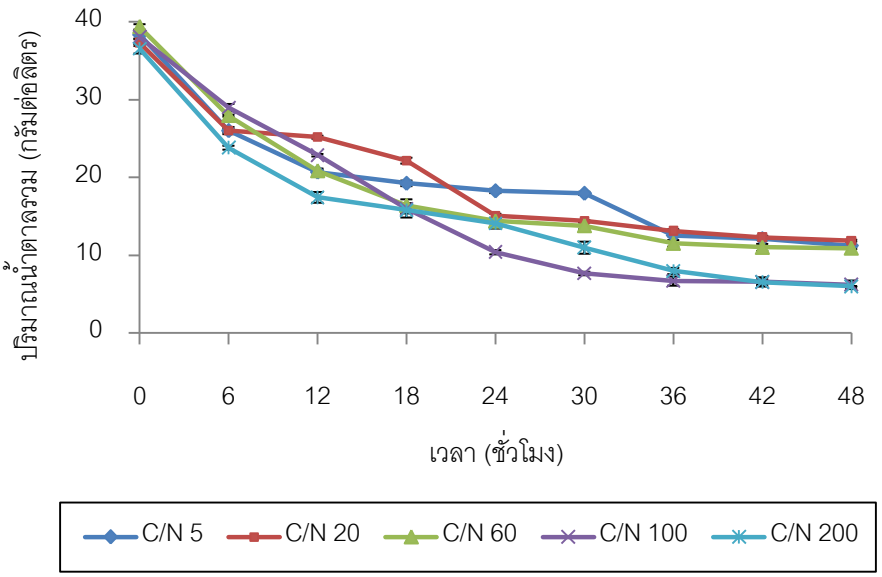


ภาพที่ 4.5 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีแนวโน้มของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่ สุด คือ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 8.692 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 และเมื่อสิ้นสุดการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.6) พบว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกั บภาวะอื่นๆ คือสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 8.555 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 มีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 0.848 กรัมต่อลิตร

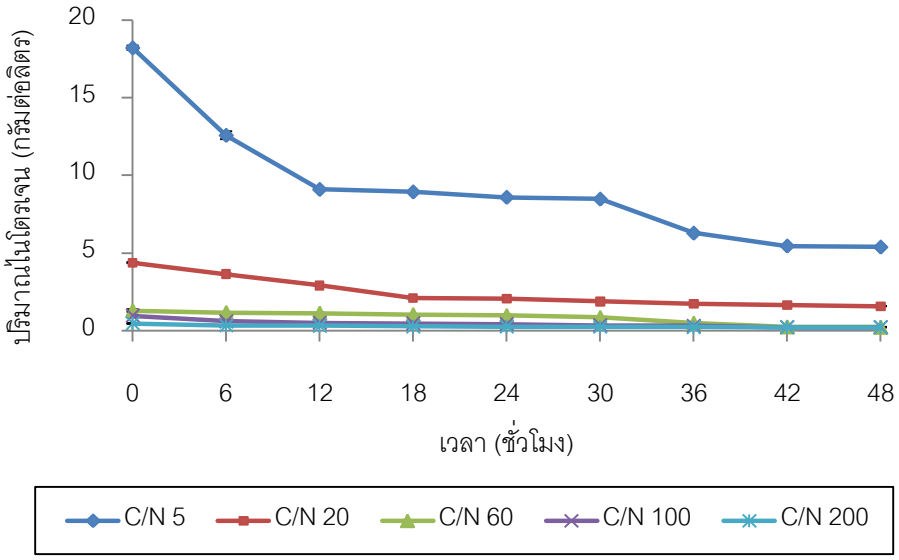


ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100และ 200



ภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากภาพที่ 4.7 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-12 ของทุกๆ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในภาพที่ 4.3 ที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในระยะดังกล่าว และหลังจากเข้าสู่ช่วง stationary phase น้ำตาลจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 พบว่าภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 และ 200 เชื้อมีการใช้น้ำตาลได้ดี โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ เท่ากับ 6.216 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.8 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งยังคงมีปริมาณไนโตรเจนคงเหลืออยู่เล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 4.8

จากการศึกษาผลของการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และเมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ 200 มีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ (h^{-1})) อัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate; ρ (g-EPS/g-CDW/h)) ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$; g-CDW/g-sugar) ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$; g-EPS/g-sugar) และความสามารถในการผลิต (productivity; g-EPS/l/h) ที่เหมาะสม ดังนั้น จึงเลือกใช้การแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 สำหรับการทดลองในขั้นต่อไ ป

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200

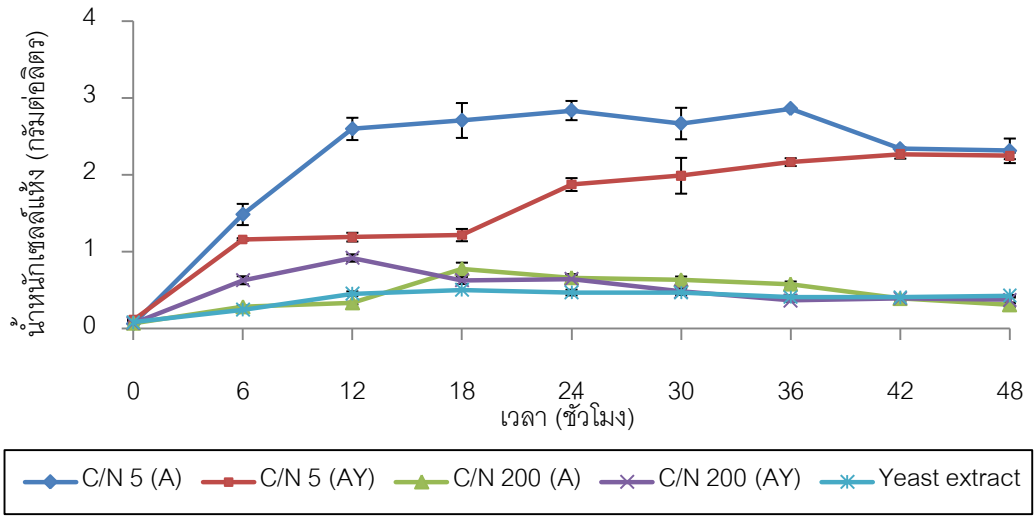
Kinetics parameters	C/N 5	C/N 20	C/N 60	C/N 100	C/N 200
μ, specific growth rate (h^{-1})	0.093	0.0582	0.0579	0.0447	0.0520
γ, specific consumption rate (g-sugar/g-CDW/h)	0.474	1.5261	1.6640	2.0761	1.7914
ρ, specific production rate (g-EPS/g-CDW/h)	0.1569	0.056	0.1801	0.2336	0.2497
$Y_{x/s}$, cell yield coefficient (g-CDW/g-sugar)	0.0773	0.0201	0.0180	0.0111	0.0162
$Y_{p/s}$, conversion yield of substrate to product (g-EPS/g-sugar)	0.3179	0.0409	0.1131	0.0986	0.1551
Productivity (g-EPS/l/h)	0.178 (48h)	0.017 (48h)	0.060 (48h)	0.066 (48h)	0.065 (48h)

4.2.2 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน

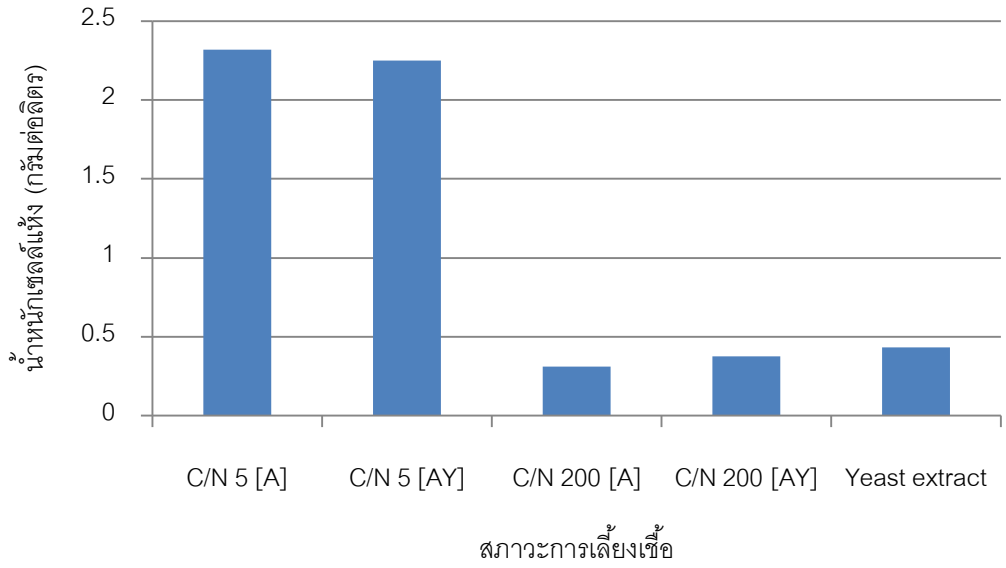
เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 4.2.1 มาแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจน ดังต่อไปนี้

- ภาวะ ที่มีแหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- ใน ภาวะ ที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$
- ภาวะ ที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และปริมาณไนโตรเจน ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.9-4.14

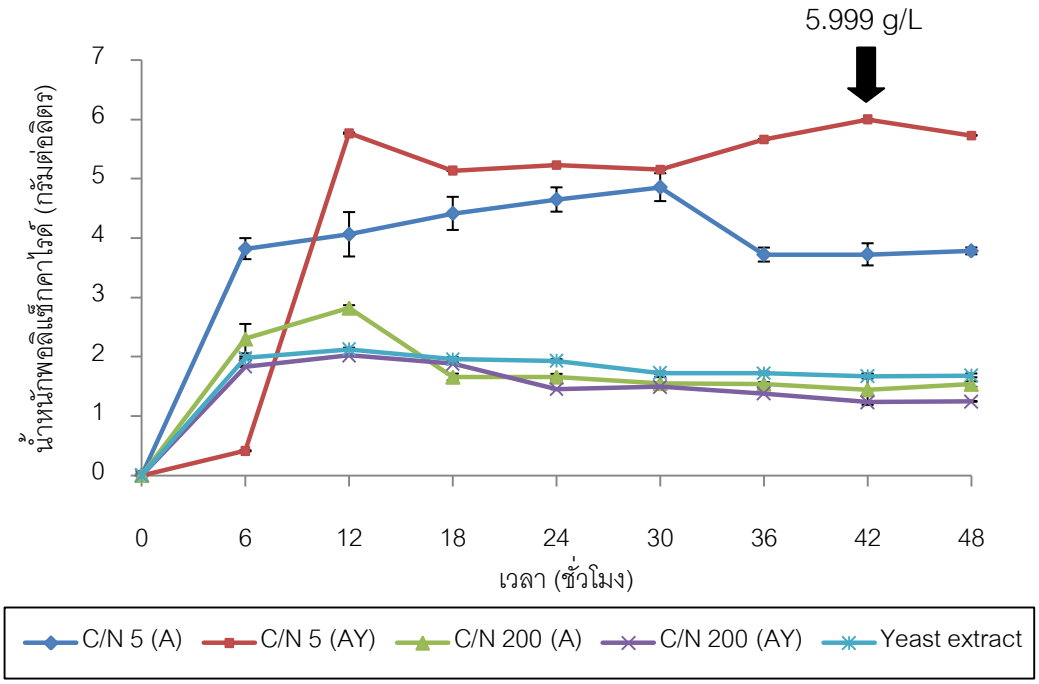


ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนขอ งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



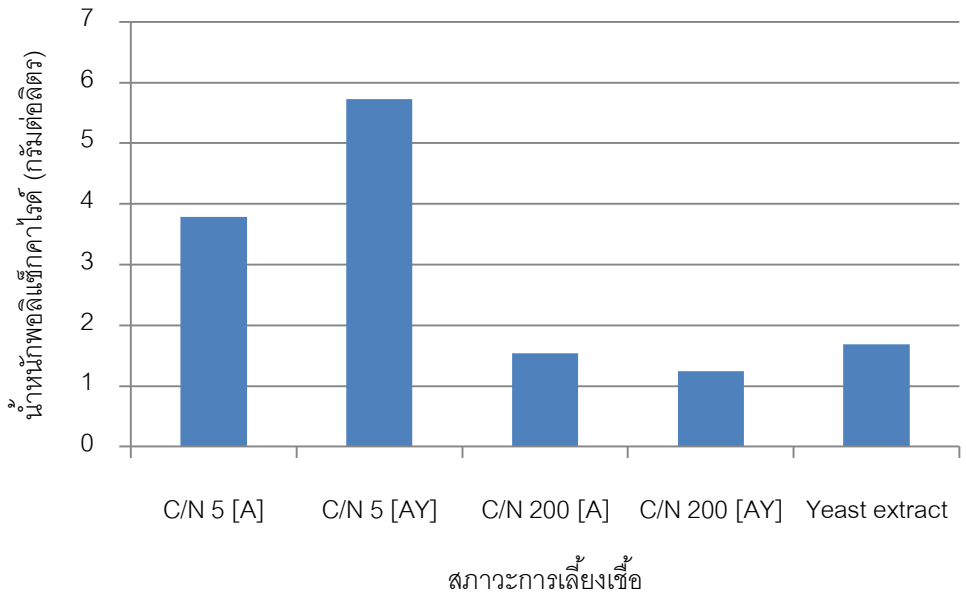
ภาพที่ 4.10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะ ที่มี การแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y

จากภาพที่ 4.9 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ในภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว มี แนวโน้มของการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.10) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ในภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวยังมีการเจริญสูงสุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.317 กรัมต่อลิตร

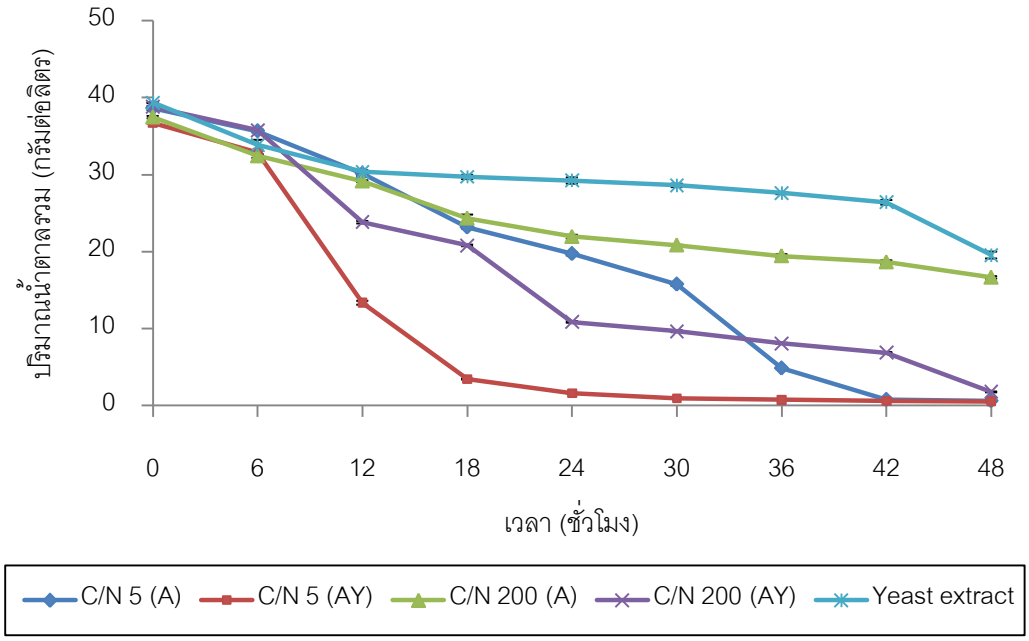


ภาพที่ 4.11 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.11 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน มีแนวโน้มของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 5.999 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และเมื่อสิ้นสุดการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.12) พบว่า อัตราส่วนข องคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ที่มีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ ภาวะ อื่นๆ คือสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 5.728 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 1.246 กรัมต่อลิตร

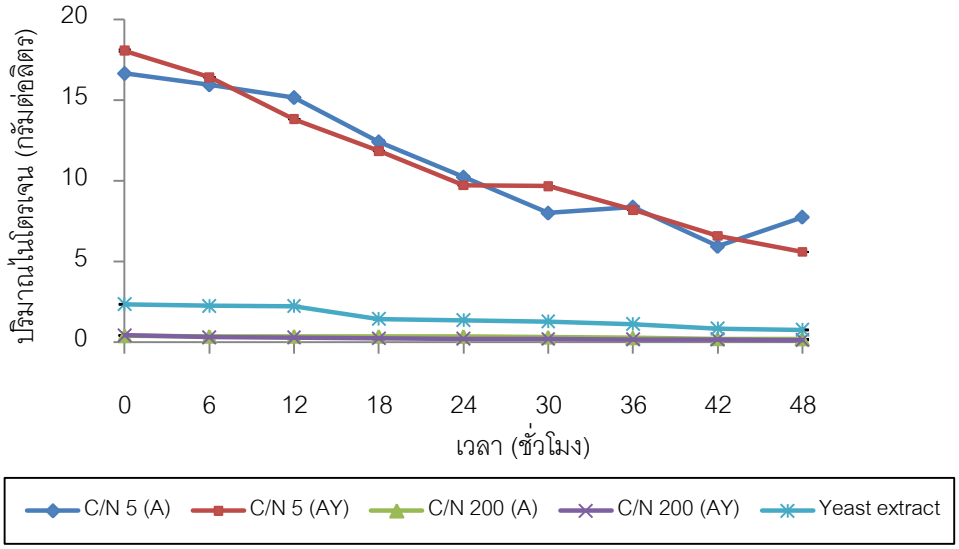


ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200



ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากภาพที่ 4.13 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-18 ของทุกๆ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในภาพที่ 4.9 ที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในระย ะดังกล่าว และหลังจากเข้าสู่ช่วง stationary phase น้ำตาลจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 พบว่าภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ทั้งสอง ภาวะ คือ ภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกั บสารสกัดจากยีสต์ และ ภาวะ ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีการใช้น้ำตาลได้ดี โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ เท่ากับ 0.563 และ0.606 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.14 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 ร่วมกับการศึกษาผลของการเติมไนโตรเจน พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งยังคงมีปริมาณไนโตรเจนคงเหลืออยู่เล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 4.14

จากการศึกษาผลของการเติมไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว หรือทั้งสองชนิดร่วมกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนและไนโตร เจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และเมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 ในภาวะที่ใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดร่วมกัน และภาวะที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว มีค่าจลนศาสตร์ที่ ใกล้เคียงกัน สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมนั้น เมื่อคำนึงถึงการลดต้นทุนในการผลิตแล้ว การใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวจึงเหมาะสมกว่า ดังนั้น จึงเลือกใช้การแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยใช้สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

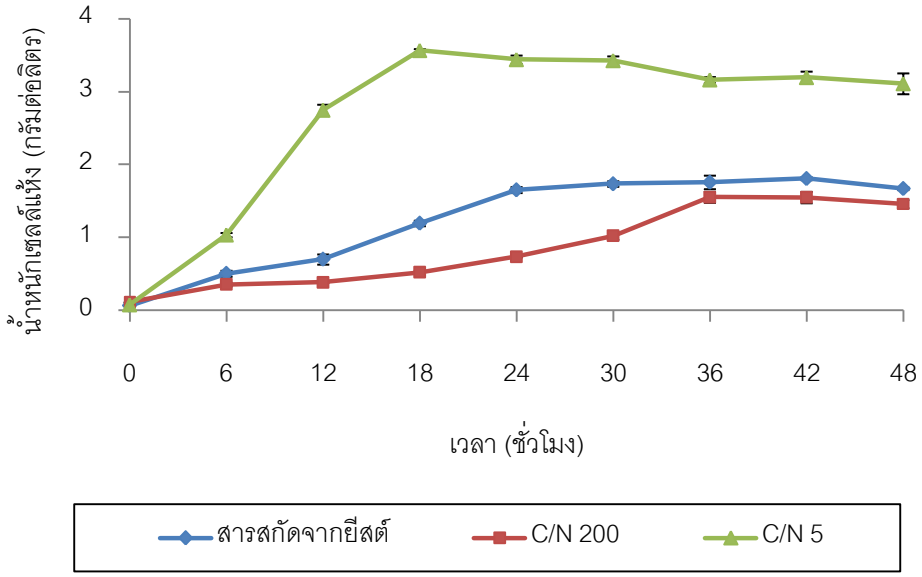
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (AY) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200

Kinetics parameters	C/N=5 (A)	C/N=200 (A)	C/N=5 (AY)	C/N=200 (AY)	Yeast extract (Y)
μ, specific growth rate (h^{-1})	0.1801	0.0551	0.0832	0.0552	0.0483
γ, specific consumption rate (g-sugar/g-CDW/h)	0.3725	1.0256	0.6511	1.4971	0.9511
ρ, specific production rate (g-EPS/g-CDW/h)	0.0504	0.0923	0.1036	0.0738	0.2016
$Y_{x/s}$, cell yield coefficient (g-CDW/g-sugar)	0.0853	0.0270	0.0525	0.0151	0.0281
$Y_{p/s}$, conversion yield of substrate to product (g-EPS/g-sugar)	0.1385	0.1030	0.1612	0.0510	0.1582
Productivity (g-EPS/l/h)	0.078 (48h)	0.032 (48h)	0.119 (48h)	0.025 (48h)	0.035 (48h)

4.3 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก

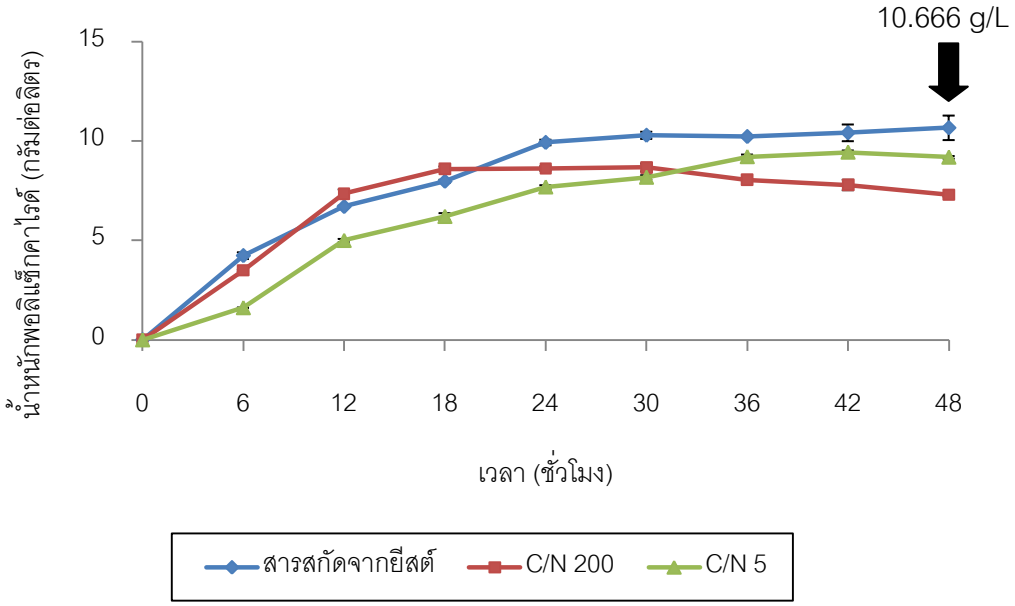
4.3.1 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปรับปรุงสูตร โดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 4.2.2 โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และปริมาณไนโตรเจน ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.15-4.24



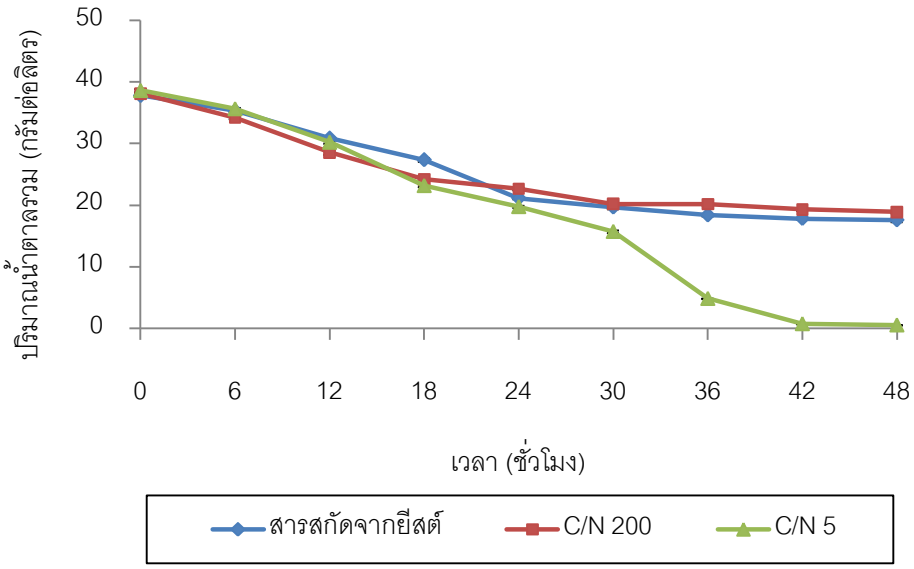
ภาพที่ 4.15 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.15 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีแนวโน้มของการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง



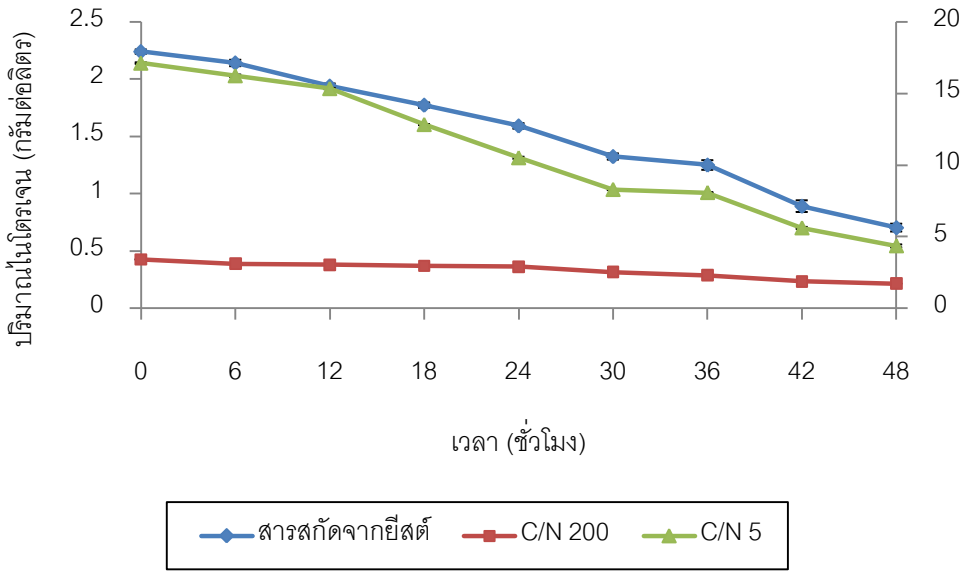
ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไ นโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.16 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใน ภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว พบว่าในภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวมีแนวโน้มของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 10.666 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48



ภาพที่ 4.17 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากภาพที่ 4.17 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกๆ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในภาพที่ 4.15 ที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในระยะดังกล่าว และหลังจากเข้าสู่ช่วง stationary phase ในภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว และภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 พบว่าน้ำตาล มีปริมาณค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 48 แต่ที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 เชื้อยังมีการใช้น้ำตาลจนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 4.18 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 และในภาวะที่ไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงอย่าง ต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 4.18

จากการศึกษาผลของการแป รผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม เมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า ในภาวะ ที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) และความสามารถในการผลิต (productivity) มากที่สุดคือ 0.5692 g-EPS/g-sugar และ 0.444 g-EPS/l/h ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ ดังนั้น จึงเลือกใช้การเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนโดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y)

Kinetics parameters	C/N=5 (A)	C/N=200 (A)	Yeast extract (Y)
μ, specific growth rate (h^{-1})	0.1094	0.0669	0.0935
γ, specific consumption rate (g-sugar/g-CDW/h)	0.3218	0.6439	0.4331
ρ, specific production rate (g-EPS/g-CDW/h)	0.0904	0.2831	0.2371
$Y_{x/s}$, cell yield coefficient (g-CDW/g-sugar)	0.1067	0.0599	0.089
$Y_{p/s}$, conversion yield of substrate to product (g-EPS/g-sugar)	0.2856	0.4845	0.5692
Productivity (g-EPS/l/h)	0.3825 (24h)	0.3038 (24h)	0.4440 (24h)

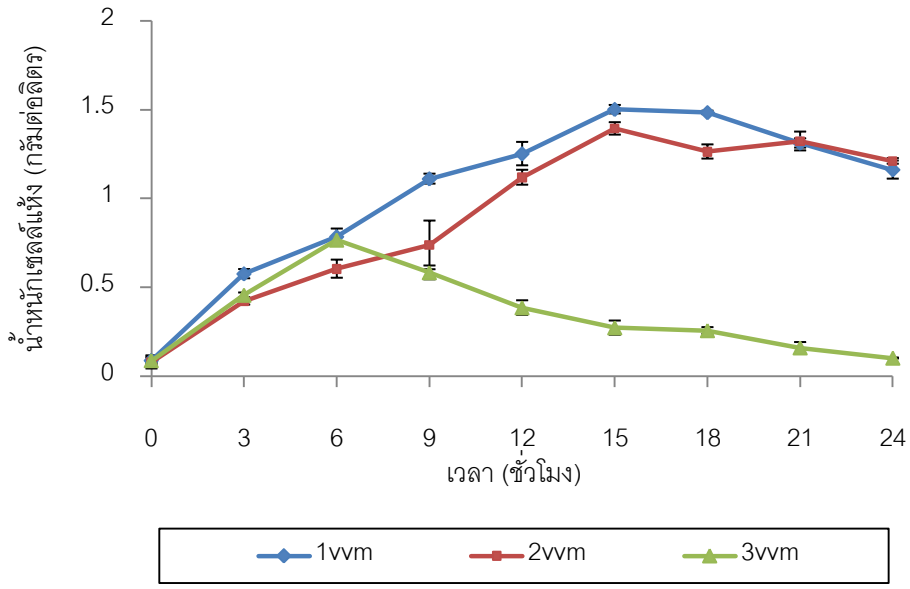
4.3.2 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนของใบพัด จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้ หัวเชื้อ เริ่มต้น ปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปรับปรุงสูตร โดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการศึกษาแหล่งของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว โดยใช้อัตราเร็วการกวนของใบพัด เท่ากับ 200 รอบต่อนาที แล้วแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1 2 และ3 vvm ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็น เวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และ ปริมาณน้ำตาลรวม ได้ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 4.19-4.23 พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm มีอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 3 vvm มีการเจริญน้อยที่สุด โดยในชั่วโมงที่ 0-15 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณ ในระยะ log phase ดังแสดงในภาพที่ 4.19 และเมื่อพิจาณาน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 4.20) พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm ยังมีการเจริญของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 1.21 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm คือ 1.161 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราการให้อากาศที่ 3 vvm พบการเจริญน้อยที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร

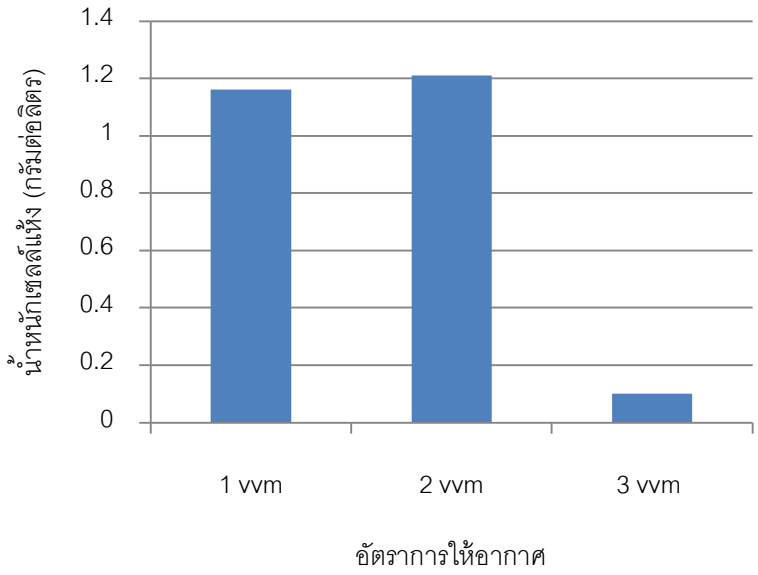
ดังภาพที่ 4.21 เมื่อพิจาณาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.78 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศที่ 2 vvm ส่วนที่อัตราการให้ อากาศเท่ากับ 3 vvm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด เมื่อพิจารณาร่วมกับการผลิตการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 4.22) พบว่า อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm ยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.272 กรัมต่อลิตร ส่วนอัตราการให้อากาศที่ 3 vvm ผลิตได้น้อยที่สุด เท่ากับ 6.435 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณา ปริมาณน้ำตาลรวม ในชั่วโมงที่ 0- 12 ชั่วโมง ของทุกอัตราการให้อากาศ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในภาพที่ 4.19 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญแบบทวีคูณ และหลังจากการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4.23

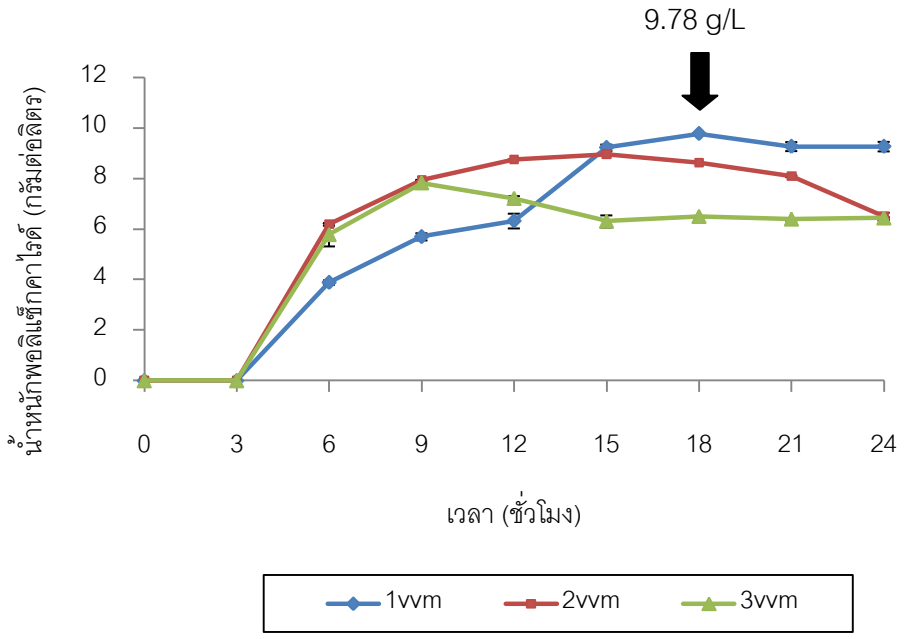
เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 24 ของแต่ละอัตราการให้อากาศ มาเปรียบเทียบกัน ร่วมกับค่าจลนพลศาสตร์ในตารางที่ 4.6 พบว่าอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด และเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm



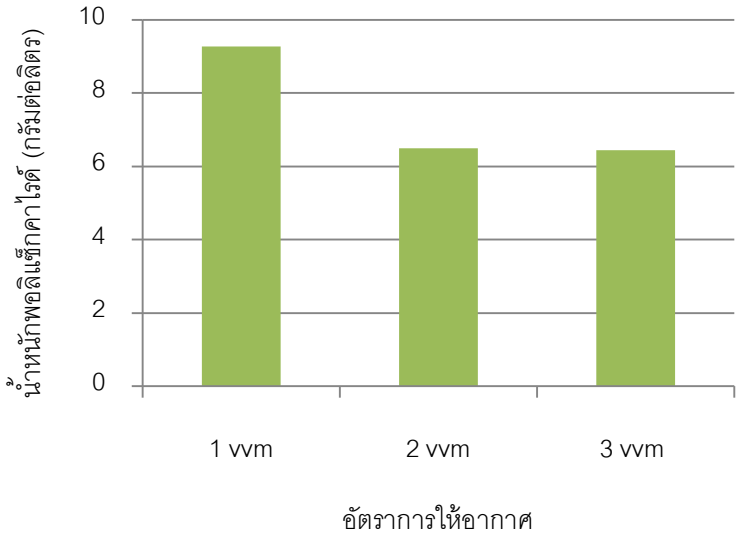
ภาพที่ 4.19 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



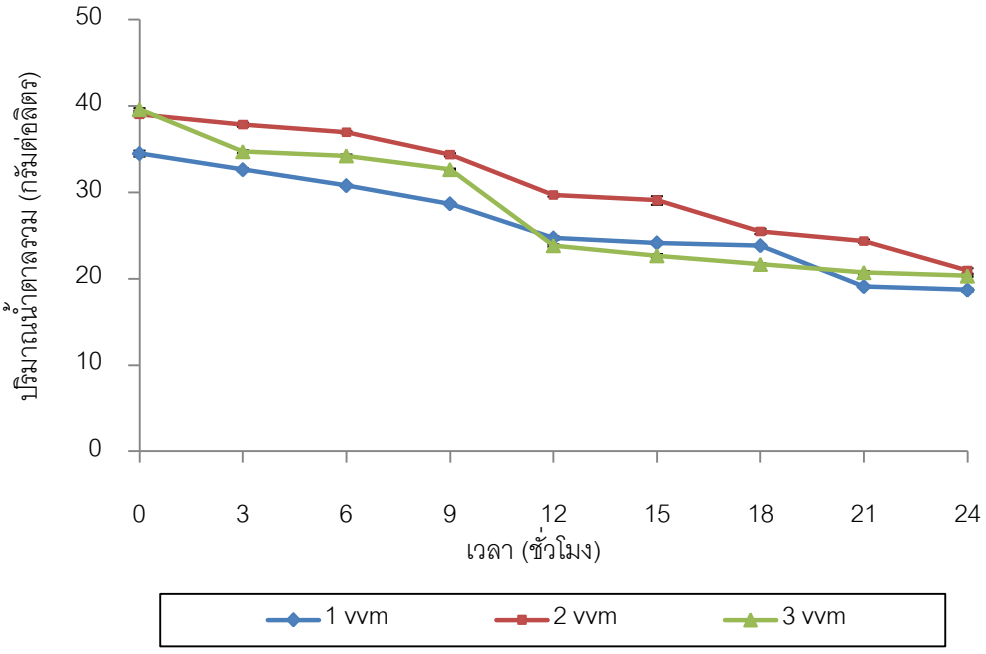
ภาพที่ 4.20 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.21 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.22 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.23 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กค าไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็น เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm

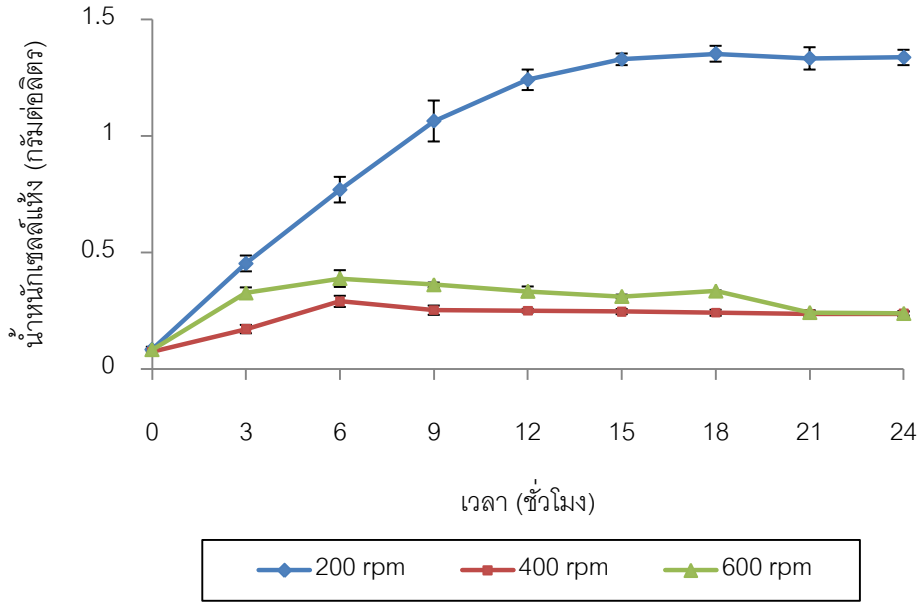
Kinetics parameters	1 vvm	2 vvm	3 vvm
μ, specific growth rate (h^{-1})	0.1561	0.1569	0.058
γ, specific consumption rate (g-sugar/g-CDW/h)	0.6777	0.854	2.2393
ρ, specific production rate (g-EPS/g-CDW/h)	0.4718	0.4993	0.9174
$Y_{x/s}$, cell yield coefficient (g-CDW/g-sugar)	0.1008	0.0873	0.0127
$Y_{p/s}$, conversion yield of substrate to product (g-EPS/g-sugar)	0.7000	0.6104	0.3956
Productivity (g-EPS/l/h)	0.3585 (24h)	0.2708 (24h)	0.2681 (24h)

4.3.3 ศึกษาอัตราเร็วใบกวน ที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

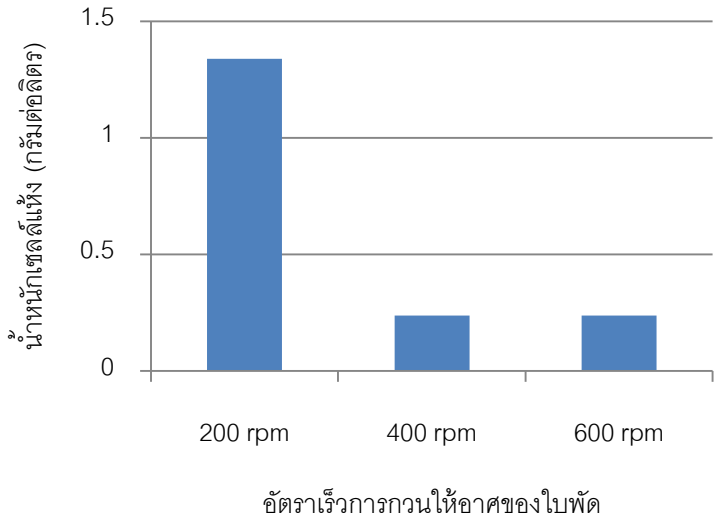
อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัด ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ การกวนยังทำให้จุลินทรีย์และสารอาหารที่ใช้ไม่ตกตะกอน เกิดการผสมและสัมผัสกันอย่างสม่ำเสมอ จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้ หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการศึกษาแหล่งของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว โดย มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm แล้วแปรผันอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเป็น 200 400 และ600 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณน้ำตาลรวม ได้ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 4.24-4.28 พบว่า อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm มีการเจริญของเชื้อสูงสุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 400 และ600 พบการเจริญที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.24) ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตพอลิแซ็กคา ไรด์ ดังภาพที่ 4.26 โดยพบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่อัตราเร็วการกวนใบพัดเท่ากับ 200 มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด และมีแนวโน้มของการผลิตเพิ่มสูงขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง ส่วนที่อัตราเร็วในการกวนใบพัดเท่ากับ 400และ600 rpm มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราเร็วในการกวนใบพัดเท่ากับ 400 rpm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่า เมื่อพิจารณาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 4.27) พบว่า ที่อัตราเร็วการกวนใบพัดเท่ากับ 200 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เท่ากับ 5.584 กรัมต่อลิตร และที่อัตราเร็วการกวนใบพัดเท่ากับ 600 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2.813 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรวม พบว่า ในช่วง 0-6 ชั่วโมง ของทุกอัตราเร็วการกวนใบพัดมีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในภาพที่ 4.24 ซึ่งมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในระยะ log phase และหลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phaseแล้ว ปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4.28

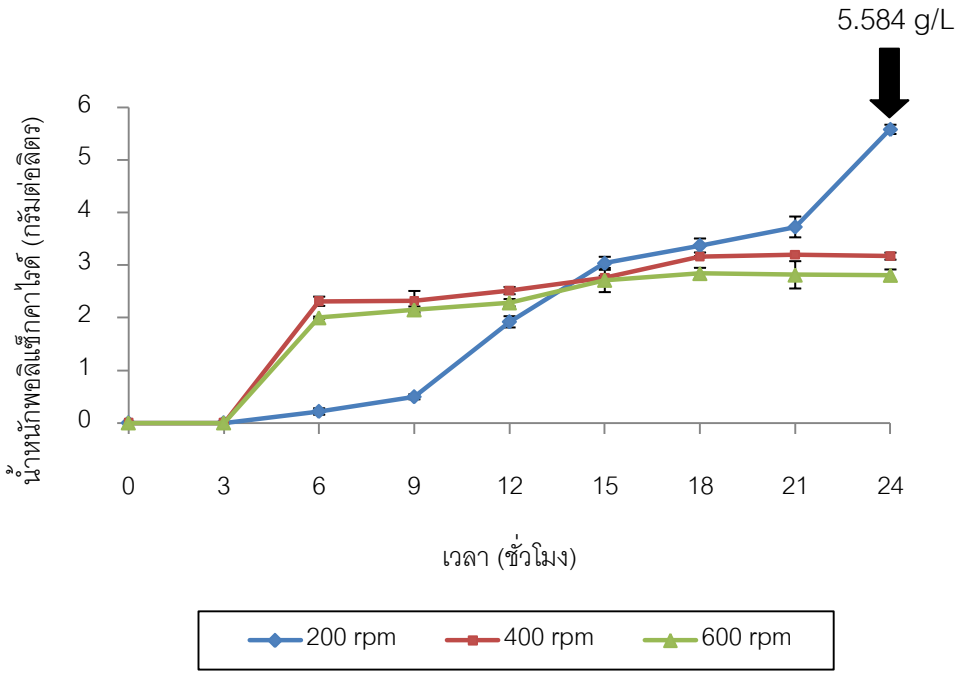
เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 24 ของแต่ละอัตราการให้อากาศ มาเปรียบเทียบกัน ร่วมกับค่าจลนพลศาสตร์ในตารางที่ 4.7 พบว่าอัตราการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด และเป็น ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้อัตราการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



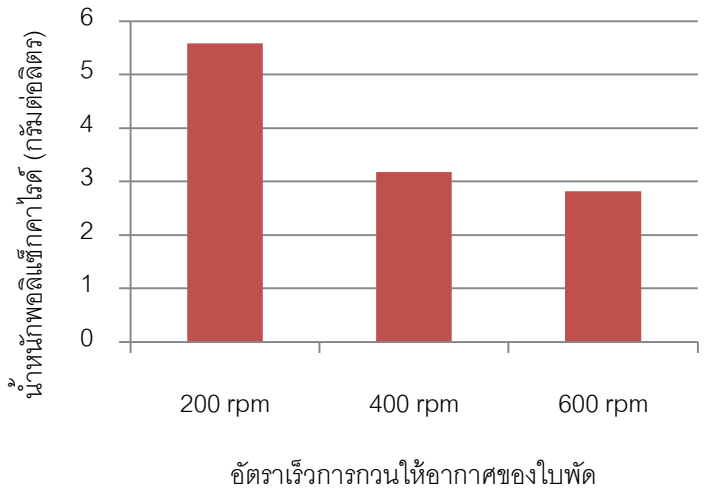
ภาพที่ 4.24 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



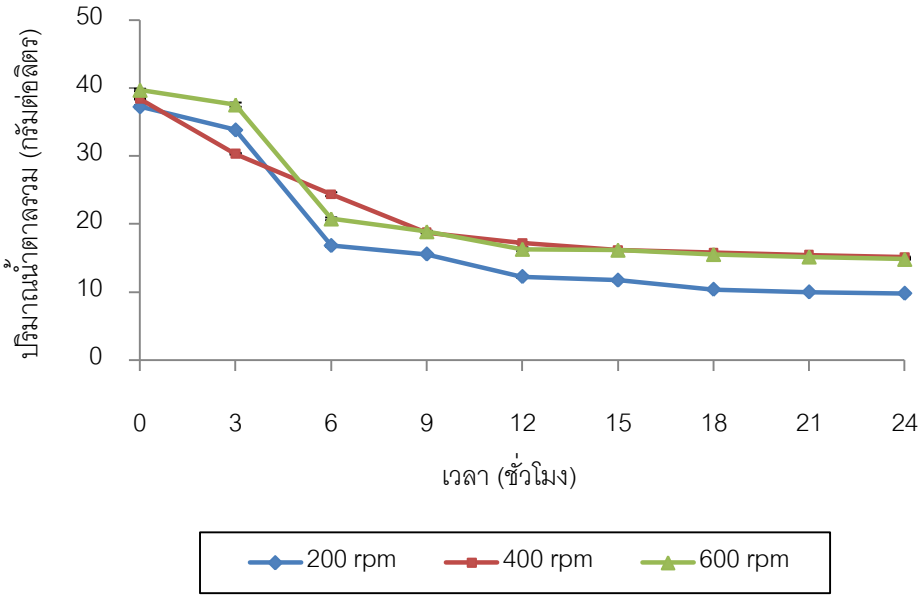
ภาพที่ 4.25 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง เชื้อเป็นเวลา24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.26 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.27 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง



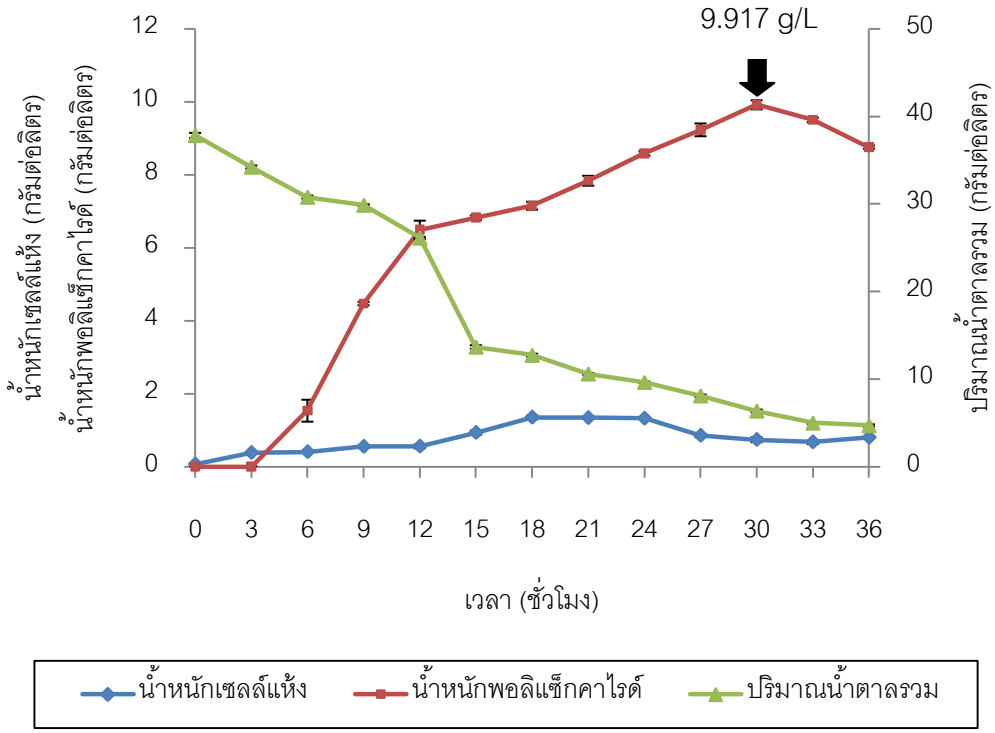
ภาพที่ 4.28 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราความเร็วในการกวนของใบพัดที่ 200 400 และ 600 rpm

Kinetics parameters	200 rpm	400 rpm	600 rpm
μ, specific growth rate (h^{-1})	0.1577	0.0697	0.074
γ, specific consumption rate (g-sugar/g-CDW/h)	1.5093	5.5396	4.3194
ρ, specific production rate (g-EPS/g-CDW/h)	0.2067	0.7335	0.4819
$Y_{x/s}$, cell yield coefficient (g-CDW/g-sugar)	0.0455	0.0082	0.01
$Y_{p/s}$, conversion yield of substrate to product (g-EPS/g-sugar)	0.1106	0.1295	0.1101
Productivity (g-EPS/l/h)	0.2326 (24h)	0.1321 (24h)	0.1172 (24h)

4.3.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 4.4.2 บรรจุอยู่ ใช้อัตราการให้อากาศ เท่ากับ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวน ที่ 200 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณน้ำตาลรวม ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.29 พบว่าเชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.917 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อพิจาณาค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่า มีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ) เท่ากับ 0.1605 h^{-1}, อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (specific consumption rate; γ) เท่ากับ 1.9214 g-sugar/g-CDW/h, อัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate; ρ) เท่ากับ 0.5896 g-EPS/g-CDW/h, ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.0453 g-CDW/g-sugar, ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.3060 g-EPS/g-sugar และความส ามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.3305 g-EPS/l/h ในชั่วโมงที่ 30



ภาพที่ 4.29 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm และอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm

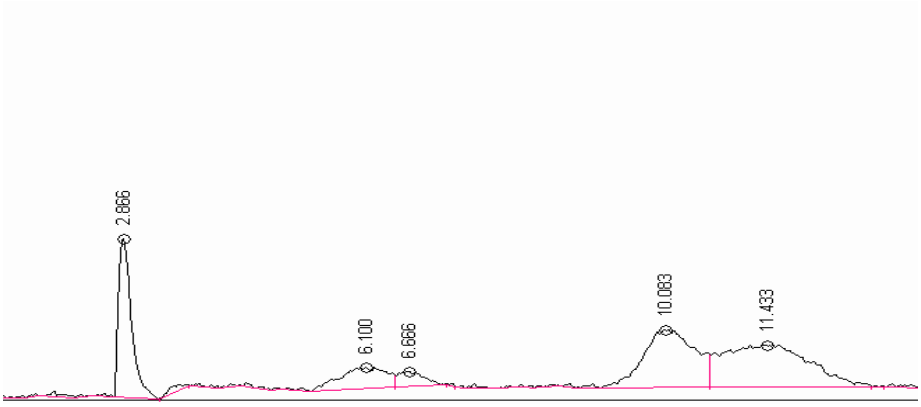
4.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

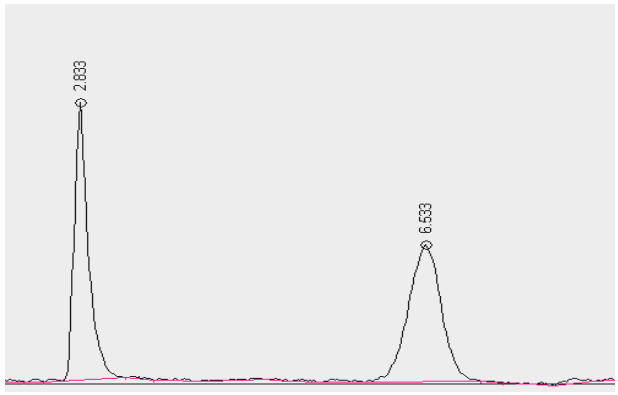
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors (วิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.30

ตารางที่ 4.8 ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

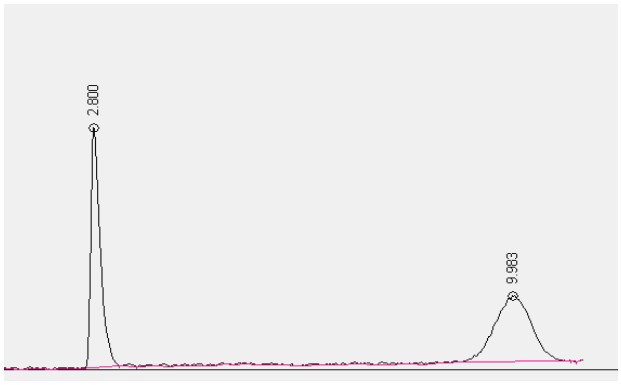
การผลิต	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
ระดับขวดเขย่า	กาแลคโทส กลูโคส และไซโลส
ระดับถังหมัก	กาแลคโทส กลูโคส และไซโลส



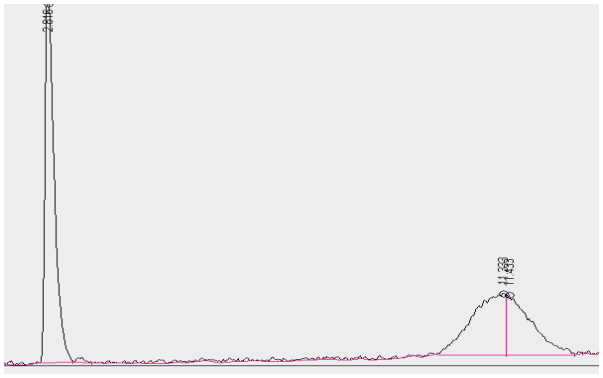
ภาพที่ 4.30 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 4.31 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (ไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ก) สารละลายมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

ข) สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

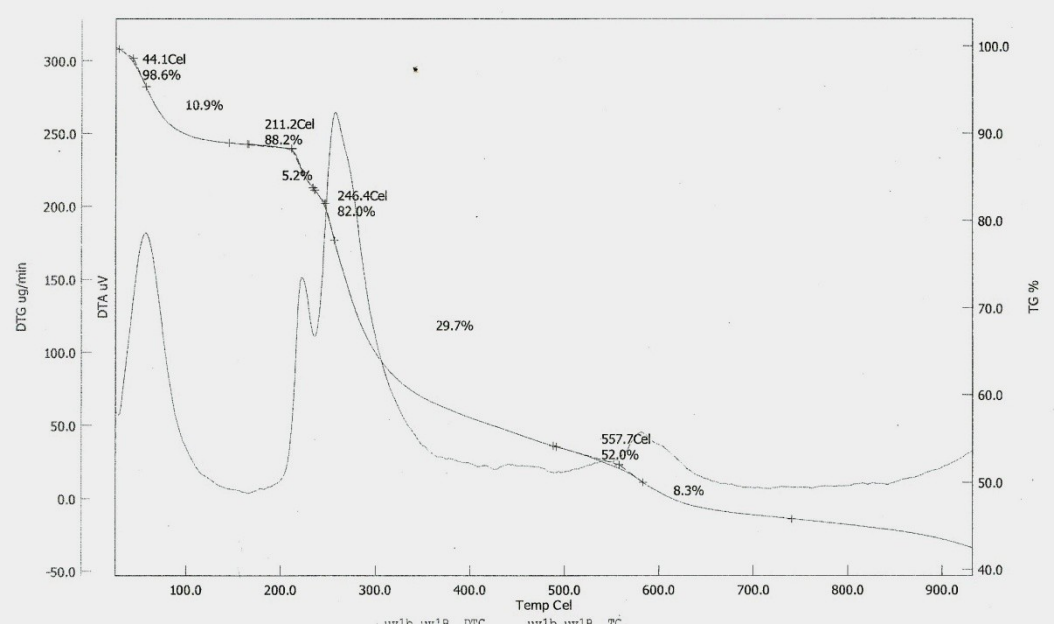
ค) สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกาแลกโทส

4.4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ปริมาณ 20–25 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Simultaneous Thermal Analyzer (STA) ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2004) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 ภาพที่ 4.32 และภาพที่ 4.33

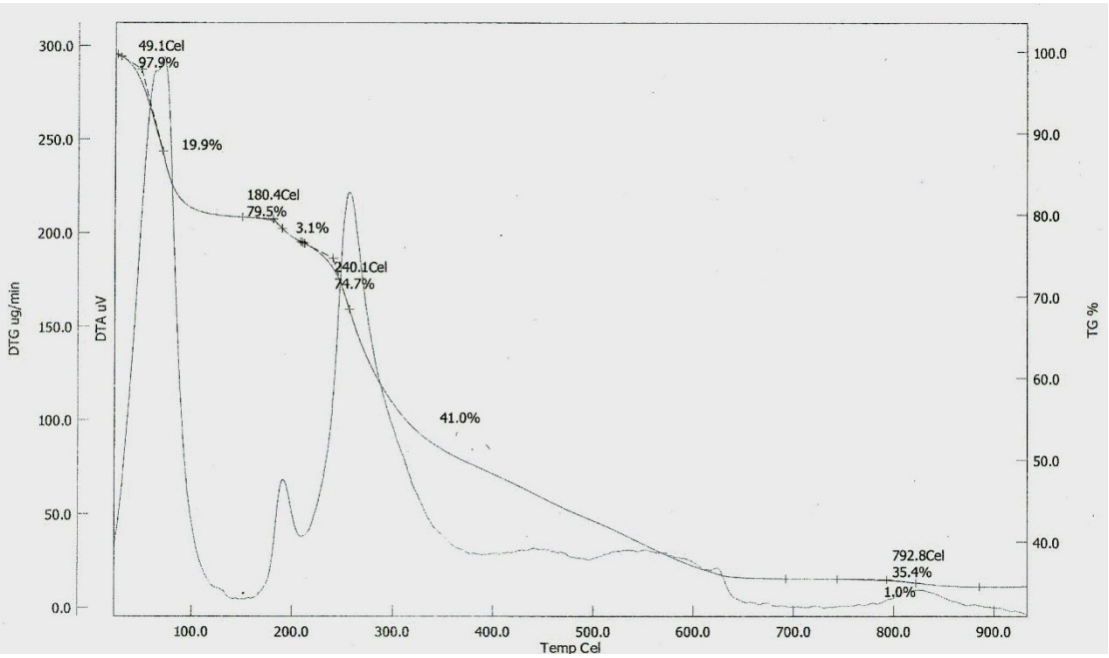
ตารางที่ 4.9 แสดงอุณหภูมิการย่อยสลายที่จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายของพอลิแซ็ กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

การผลิต	จำนวนขั้นตอน กระบวนการสลาย	อุณหภูมิการย่อยสลาย (องศาเซลเซียส)
ระดับขวดเขย่า	1	30-150
	2	170-250
	3	260-490
	4	560-730
ระดับถังหมัก	1	30-150
	2	180-210
	3	250-690
	4	750-880



ภาพที่ 4.32 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E.cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 แสดงดังภาพที่ 4.19 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 4 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 30-150 องศาเซลเซียส มีการลดลงของน้ำหนัก 10.90% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีใน พอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียสจนถึง 250 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5.20% กระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 260 – 490 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 29.70% และกระบวน การสลายในขั้นตอนที่ 4 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 560-730 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 4 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 8.3%



ภาพที่ 4.33 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมักโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 แสดงดังภาพที่ 4.19 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 4 ขั้นตอนเช่นกัน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 30-150 องศาเซลเซียสมีการลดลงของน้ำหนัก 19.90% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีใน พอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสจนถึง 210 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 3.10% กระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 250 – 690 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 41.0% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 4 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 750-880 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 4 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 1.0%

4.4.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ต่อระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้หรือเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) (Tako และคณะ, 1982) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

พอลิแซ็กคาไรด์	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์
UV1-9 (ในระดับขวดเขย่า)	28.17
UV1-9 (ในระดับถังหมัก)	25.60
แซนแทน	5.82
กัวกัม	30
คาราจีแนน	49.2

จากตารางที่ 4.10 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจาก พอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 28.17 และ 25.60 % ตามลำดับ แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่าตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ ได้แก่ กัวกัม แ ละคาราจีแนน ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการอุ้มน้ำของแซนแทน พบว่า แซนแทนมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูงกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ของสายพันธุ์ UV1-9 ทั้งจากการผลิตในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก

4.4.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Collins และคณะ, 1973) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ทั้งจากการผลิตในระดับขวดเขย่า และระดับถังหมัก สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิ ห้อง ให้ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความข้นหนืดเช่นเดียวกันกับแซนแทน

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

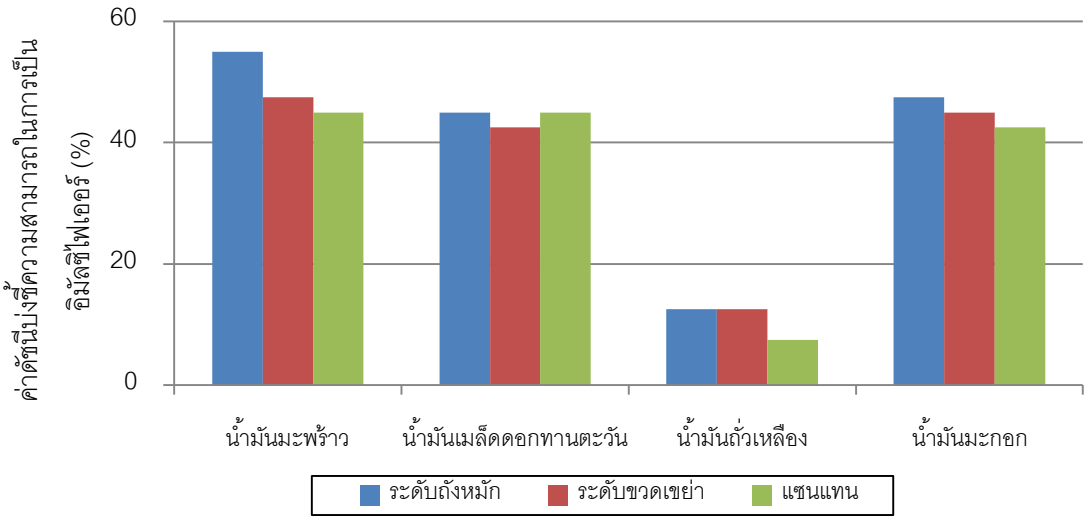
พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย	ความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์
UV1-9 (ในระดับขวดเขย่า)	ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด
UV1-9 (ในระดับถังหมัก)	ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด
แซนแทน	ละลายน้ำดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด

4.4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาวัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifing activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.34

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช ในอัตราส่วน 1:1

พอลิแซ็กคาไรด์	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (%)			
	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันมะกอก
UV1-9 (ในระดับขวดเขย่า)	46	42	40	44
UV1-9 (ในระดับถังหมัก)	48.6	44	44	44.6
แซนแทน	42	38.6	40.6	40.6
น้ำกลั่น	0	0	0	0

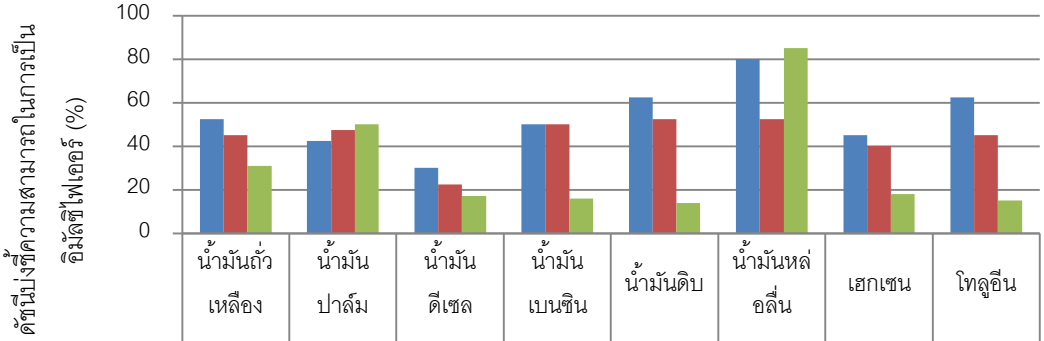


ภาพที่ 4.34 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ

จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอก สูงกว่าแซนแทน โดยมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันมะพร้าวสูงสุด คือ 55% และสำหรับในน้ำมันเมล็ดดอกท านตะวัน พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสามชนิดมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่ใกล้เคียงกัน

4.4.6 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับ น้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Cooper และGoldenberg, 1987)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์จากระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟเออร์ และคำนวณหา ค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsification index (E_{24})) ได้ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.35



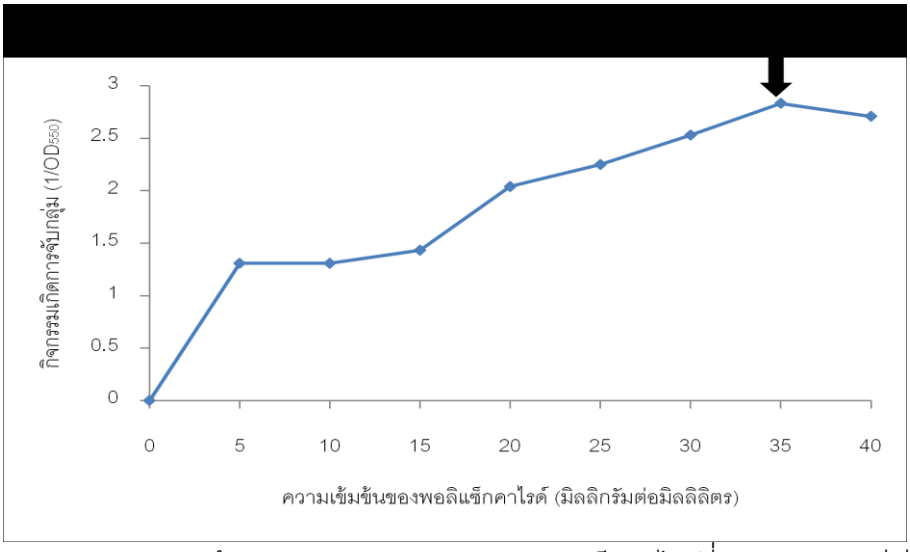
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันดีเซล	น้ำมันเบนซิน	น้ำมันดิบ	น้ำมันหล่อลื่น	เฮกเซน	โทลูอีน
ระดับถังหมัก	52.5	42.5	30	50	62.5	80	45	62.5
ระดับขวดเขย่า	45	47.5	22.5	50	52.5	52.5	40	45
แซนแทน	31	50	17	16	14	85	18	15

ภาพที่ 4.35 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

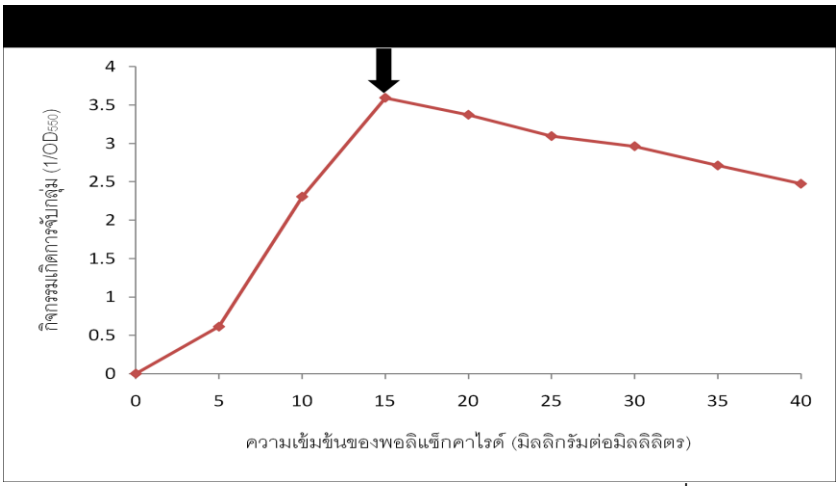
จากภาพที่ 4.35 แสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ที่ผลิตจากระดับถังหมักมีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันชนิดต่างๆได้ดีกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับขวดเขย่า โดยมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันจากพืช ได้แก่น้ำมันถั่วเหลือง และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ เฮกเซน และโทลูอีนได้ดีกว่าแซนแทน โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคที เรียสายพันธุ์ UV1-9 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ไปประยุกต์ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อมได้

4.4.7 การศึกษาความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์ (Kurane และคณะ, 1986)

ทำการแปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5 10 15 20 25 30 35 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากกนั้นนำมาวิเคราะห์และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) ได้ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 4.36 และ4.37 โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับถังหมักมีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และดีกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับขวดเขย่า



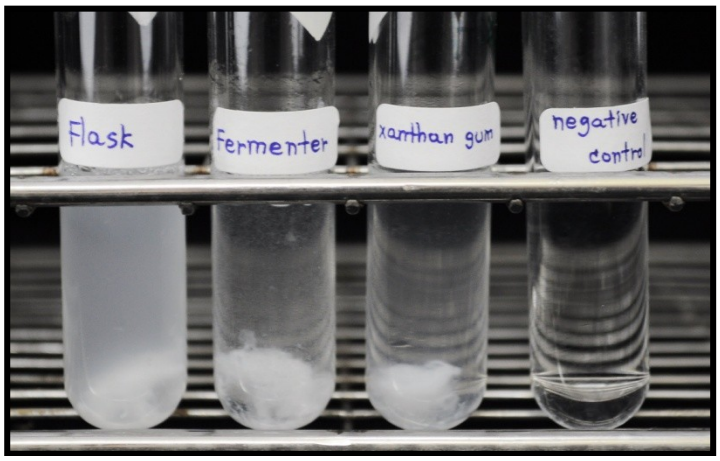
ภาพที่ 4.36 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.37 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4.8 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ จะทำ ให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง ได้ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 4.38 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีประจุลบ (Acidic polysaccharide)



(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพที่ 4.38 ลักษณะตะกอนสีขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ภายหลังการเติมสารละลาย Cetylpyridiniumchloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล

(ก) สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับขวดเขย่า

(ข) สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับถังหมัก

(ค) สารละลายแซนแทนกัม (ชุดควบคุมบวก)

(ง) สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมลบ)

4.4.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.13 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับขวดเขย่า และระดับถังหมักมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 85.3 และ 88% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

การผลิต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)
ระดับขวดเขย่า	85.3
ระดับถังหมัก	88

4.4.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.14 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับขวดเขย่า และระดับถังหมักมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 5.8 และ 3.6% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.14 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตได้แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

การผลิต	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ (%)
ระดับขวดเขย่า	5.8
ระดับถังหมัก	3.6

4.4.10 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นนำมาวัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Viscometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mata และคณะ, 2008) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.15 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีค่าความหนืดน้อยกว่าแซนแทนซึ่งผลิตใช้ในอุตสาหกรรม

ตารางที่ 4.15 ค่าความหนืดของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย	ค่าความหนืด (cps)
UV1-9 (ระดับขวดเขย่า)	8.8
UV1-9 (ระดับถังหมัก)	13.0
แซนแทน	35.2

บทที่5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากสมบัติทางเคมีและกายภาพที่มีความหลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทำให้มีประโยชน์อย่างมากในการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อตอบสนองความต้องการของการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีอยู่มากในปัจจุบัน ในงานวิจัยนี้ จึงศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปพัฒนาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมักแบบแบตช์ ตลอดจนศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4.0% $(NH_4)_2SO_4$ความเข้มข้น 1.0% และยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีรูปแบบการเจริญในระยะเริ่มต้นค่อนข้างสั้น โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 ซึ่งเป็นระยะ log phase และมีเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อพิจารณารูปแบบของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามีการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (growth-associated) โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 8.051 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จึงเป็นสารเมทาบอไลท์แบบปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bergmaier และคณะ (2002) ที่รายงานว่า แบคทีเรียสามารถเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดภายในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงสุดในช่วงสุดท้ายของการเจริญแบบทวีคูณไปจนถึงช่วงเริ่มต้นของระยะ stationary phase (early stationary phase)

การเลือกใช้แบคทีเรียสายพันธุ์กลายสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นั้นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ ความเสถียรในการผลิต จากการศึกษาความเสถียรในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 โดยถ่ายเชื้อทุกวันเป็นเวลาใน 150 วัน แล้วสุ่มตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าเชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 0.382 กรัมต่อลิตร และน้อยที่สุด

เท่ากับ 0.346 ซึ่งเมื่อพิจาณาแล้ว พบว่ามีค่าต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งไม่เกิน 0.036 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 7.578 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตได้น้อยที่ สุดเท่ากับ 6.516 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ค่าต่างไม่เกิน 1.062 กรัมต่อลิตร สรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีความเสถียรในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ในการศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีประสิทธิภาพ โดยแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีการเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดในภาวะที่มี C/N 5 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.187 กรัมต่อลิตรและสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 8.555 กรัมต่อลิตรในเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของ C/N 5 มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณสูงมาก ซึ่งแหล่งไนโตรเจนนั้นเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า ภาวะดังกล่าวนี้มีการเจริญของเชื้อสูง ดังนั้นจึงทำให้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงเช่นเดียวกัน ในขณะที่ C/N 100 และC/N 200 ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีใกล้เคียงกัน คือสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 3.192 และ3.152 กรัมต่อลิตร ตามลำ ดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vergas-Garcia และคณะ (2001) ที่รายงานว่าในภาวะที่มีการเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูง (อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อย) จะมีผลทำให้ได้น้ำหนักเซลล์สูง และพบว่าส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีในภ าวะการเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนน้อย เมื่อพิจารณาผลของการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ร่วมกับค่าจลนศาสตร์ พบว่า ที่ C/N 5 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ) มากที่สุดเท่ากับ 0.093 h^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ C/N 5 และC/N 200 ให้ค่าปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) มากที่สุด เท่ากับ 0.3179 และ0.1551 g-EPS/g-sugar ตามลำดับ และสำหรับภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ C/N 200 ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณน้อย แต่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีนั้นเนื่องมาจาก ในขณะ เชื้อมีการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และมีการใช้แหล่งไนโตรเจนลดน้อยลงเรื่อยๆ เชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งมีปริมาณมากพอในการคงสภาพของเชื้อให้สามารถเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไปได้สิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ จากการพิจาณาค่าจลนศาสตร์ที่เหมาะสม จึงเลือก C/N 5 และC/N 200 สำหรับการศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนต่อไป

เนื่องจากในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) มีแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และ yeast extract ในการศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนจึงเลือก C/N 5 และC/N 200 มาศึกษา โดยแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ yeast extract และใช้แหล่งไนโตรเจนสองชนิดร่วมกัน จากผลการทดลอง พบว่าที่ C/N 5 ทั้งสองภาวะ คือภาวะที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตร่ว มกับ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว มีการเจริญดีที่สุด คือ มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.251 และ2.317 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เท่ากับ 5.728 และ3.782 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับภาวะที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 1.684 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ พบว่า C/N 5 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดร่วมกันมีค่า μ สูงสุด เท่ากับ 0.1801 ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/s}$ พบว่า C/N 5 ในภาวะที่ใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด มีค่ามากที่สุดเช่นเดียวกัน คือ $Y_{p/s}$= 0.1612 g-EPS/g-sugar โดยมีค่าใกล้เคียงกับ C/N 5 ที่ใช้ไนโตรเจนชนิดเดียว และภาวะที่ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่า $Y_{p/s}$= 0.1385 และ 0.1582 g-EPS/g-sugar ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวหรือทั้งสองชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อคำนึงถึงการลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว จึงเลือกภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวสำหรับการผลิตในระดับถังหมักต่อไป

ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ในขั้นตอนแรกได้เลือกภาวะที่มีการแปรผัน C/N 5 และC/N 200 ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว เปรียบเทียบกับภาวะที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม ผลการทดลองเมื่อพิจาณาจากการเจริญของเชื้อ พบว่า C/N 5 มีการเจริญดีที่สุด แต่ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เท่ากับ 10.666 กรัมต่อลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gorret และคณะ (2001) ที่รายงานว่า *Propioni bacterium acidi-propoinici* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดในภาวะที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว และจากงานวิจัยของ Prasertsan และคณะ (2008) ได้รายงานว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ [NH_4Cl NH_4NO_3 และ$(NH_4)_2SO_4$] ไม่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ WD7 ในถังหมักแบบแบตช์ ซึ่งมีเพียงแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (0.2% polypeptone และ

0.05% yeast extract) ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็เพียงพอ เมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 พบว่า C/N 5 มี μ สูงสุดเท่ากับ 0.1094 h^{-1} ซึ่งใกล้เคียงกับภาวะที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน คือ μ=0.0935 h^{-1}และภาวะที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่า $Y_{p/s}$ และ productivity สูงสุดเท่ากับ 0.5692 g-EPS/g-sugar และ 0.4440 g-EPS/l/h ในเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จึงเลือกภาวะดังกล่าวนี้สำหรับการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนต่อไป

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่มี 4% น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.1% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 2 และ3 vvm พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.78 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง โดยมีค่า μ=0.1561 h^{-1}, $Y_{p/s}$=0.700 g-EPS/g-sugar และ productivity สูงสุดเท่ากับ 0.3585 g-EPS/l/h ในเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการศึกษา อัตราเร็วใบกวน ที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแปรผันเป็น 200 400 และ600 รอบต่อนาที ผลการทดลอง พบว่าอัตราการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็น ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ อาจเนื่องมาจากออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm เพียงพอแล้วสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ อีกทั้งอัตราเร็วการกวนให้อากาศที่สูงเกินไปอาจมีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ ดังนั้นการเพิ่มอัตราการกวนให้อากาศของใบพัดที่สูงขึ้นจึงไม่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยที่อัตราการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 5.584 กรัมต่อลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง และพบว่ามีแนวโน้มของการผลิตเพิ่มมากขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง โดยมีค่า μ=0.1577 h^{-1}, $Y_{p/s}$=0.1106 g-EPS/g-sugar และ productivity สูงสุดเท่ากับ 0.2326 g-EPS/l/h ในเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasertsan และคณะ (2008) ที่รายงานว่า การเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ WD7 ในถังหมักแบบแบตช์จะลดลงเมื่อเพิ่มความอัตราเร็วในการกวนของใบพัดจาก 200 เป็น 800 รอบต่อนาที เนื่องจากอัตราเร็วการกวนให้อากาศที่สูงเกินไปมีผลทำให้เซลล์ถูกทำลาย

การติดตามการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดเบสของ อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวน ที่ 200 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 และเริ่มเข้าสู่ ภาวะ คงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็น เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.917 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อพิจาณาค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามี $\mu = 0.1605\ h^{-1}$, specific consumption rate; $\gamma = 1.9214$ g-sugar/g-CDW/h, specific production rate; $\rho = 0.5896$ g-EPS/g-CDW/h, $Y_{x/s} = 0.0453$ g-CDW/g-sugar, $Y_{p/s} = 0.3060$ g-EPS/g-sugar และความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.3305 g-EPS/l/h ในชั่วโมงที่ 30 จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้นกำเนิดที่ผลิตในระดับขวดเขย่า พบว่า การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *E. cloacae* สายพันธุ์กลาย UV1-9 ในถังหมักแบบแบตช์ให้ผลผลิตมากกว่าถึง 9 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Prasertsan และคณะ (2008) ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ WD7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract ความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักแบบแบบแบตช์ ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก และเริ่มผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 12 โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 4.80 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญคงที่ (stationary phase) ดังนั้น *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในงานวิจัยนี้จึงมีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่าถึง 2 เท่า ในเวลาในการผลิตที่น้อยกว่า

การศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ด้วยการย่อยด้วยกรดแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และการวิเคราะห์ประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ผลิตเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ (acidic heteropolysaccharide) ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามชนิดเป็น

องค์ประกอบ ได้แก่ น้ำตาลไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส เช่นเดียวกันทั้งการผลิตจากระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก โดยพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับถังหมักมีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 88% และ 3.6% ตามลำดับ ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับขวดเขย่ามีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 85.3% และ 5.8% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN 02 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้นกำเนิด (พนิดา เทียมชัยบุตร , 2551) ที่รายงานว่าเป็ นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส เป็นส่วนประกอบ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shimada และคณะ (1997) ได้ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* พบว่าผลิตเฮเทโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ ที่มีน้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส และฟูโคสเป็นองค์ประกอบ

การวิเคราะห์สมบัติความเสถียรต่อความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ที่ผลิตจากระดับถังหมักมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากระดั บขวดเขย่า และมีขั้นตอนกระบวนการสลาย 4 ขั้นตอน โดยมีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายในช่วงระหว่าง 180-690 และ170-490 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Prasertsan และคณะ (2006) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ WD7 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงในช่ วง 282-390 องศาเซลเซียส โดยเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 แล้วพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า จากสมบัติความทนต่ออุณหภูมิสูงทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีลักษณะของการเป็นผลึกที่แข็งแรง ทนทาน เมื่อได้รับความร้อน และสามารถต้านทานต่อตัวทำละลาย รวมทั้งสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตได้ดี จากสมบัติดังกล่าวนี้สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้เป็นสารเคลือบในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง (Kroschwitz, 1990) สำหรับกระบวนการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จะประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้ 1) การทำลายการดูดซับของน้ำกับพอลิแซ็กคาไรด์ 2) การกำจัดโมเลกุลของน้ำ 3) การย่อยสลายพอลิเมอร์ โดยการแตกพันธะ C–O และ C–C ในวงแหวนน้ำตาลเป็นผลให้เกิด CO, CO_2 และ H_2O 4) การเกิดโครงสร้างของ polynuclear aromatic และ graphitic carbon (Fried, 2000; Zamora และคณะ, 2002)

ความสามารถในการอุ้มน้ำ เป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของพอลิแซ็กคาไรด์สำหรับการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ จากการศึกษาความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากการผลิตในระดับถังหมักและในระดับขวดเขย่า พบว่ามีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 25.60% และ 28.17% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบแล้ว พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตใช้ในอุตสาหกรรมได้แก่ กัวกัม และคาราจีแนน ที่มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 30% และ 49.2% ตามลำดับ แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีกว่ากัวกัม และคาราจีแนน แต่ยังมีความสามารถในการอุ้มน้ำน้อยกว่าแซนแทนซึ่งมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 5.82% ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Tako และคณะ (1982) ที่รายงานว่าแซนแทนมีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 5.5% และ Chenu (1993) ได้รายงานว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ จึงทำให้ดูดซับน้ำไว้ได้ดี มีประโยชน์ในการเพิ่มการดูดซับน้ำของดินเหนียว และดินทราย จากสมบัติดังกล่าวนี้สามารถประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรี ยสายพันธุ์ UV1-9 ในการอุ้มน้ำในดินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้งานของดินเพื่อการเกษตรได้

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากทั้งการผลิตในระดับถังหมักและในระดับขวดเขย่า พบว่าสามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ให้ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความข้นหนืด ทั้งนี้ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่สามารถละลายน้ำได้หมดหรือสามารถละลายน้ำได้เพียงบางส่วนนั้น ขึ้นอยู่กับการมีหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ (BeMiller และ Whistler, 1996) และเมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มาวัดความหนืดข้น พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากระดับถังหมักค่าความหนืดสูงกว่าจากระดับขวดเขย่า โดยมีค่าความหนืดเท่ากับ 13 และ 8.8 cps ตามลำดับ แต่ยังมีค่าความหนืดน้อยกว่าแซนแทนที่มีค่าความหนืดเท่ากับ 35.2 cps จากงานวิจัยของ Garcia และคณะ (2000) ได้ศึกษาลักษณะสมบัติของแซนแทนซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม พบว่ามีความหนืดสูง นิยมใช้ในอุตสหกรรมอาหารได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ ไซรัป ซอส และโยเกิร์ต เป็นต้น ทั้งนี้พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ถึงแม้จะมีความหนืดต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ

แซนแทน แต่ยังสามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่ต้องการใช้สารให้ความหนืดไม่สูงมาก เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์

จากการศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากทั้งในระดับถังหมัก และในระดับขวดเขย่า มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอก สูงกว่าแซนแทน โดยมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันมะพร้าวสูงสุด คือ 55% จากงานวิจัยของ Abbasi และคณะ (2007) ได้รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* มีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันข้าวโพด และโทลูอีนได้ดี โดยสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทอาหารไอออนิก (ionic formulation foods)

นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ยังมีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้ ซึ่งมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันจากพืช ได้แก่น้ำมันถั่วเหลือง และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิล น้ำมันดิบ เฮกเซน และโทลูอีนได้ดีกว่าแซนแทน โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับถังหมักมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด โดยมีค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (E_{24}) ถึง 80% ซึ่งสอดคล้องกับง านวิจัยของ Willumsen และ Karlson (1997) ที่รายงานว่า หลักการพิจารณาความสามารถของการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดีของพอลิแซ็กคาไรด์นั้น ต้องมีค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (E_{24}) ไม่ต่ำกว่า50% และจากงานวิจัยของ Hua และคณะ (2010) ได้รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ TU มีสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ในการบำบัด n-hexadecane ที่มีการปนเปื้อนในดิน จากสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้ดีของพอลิแซ็กคาไรด์จ ากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 สามารถใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อม โดยใช้บำบัดดินที่มีการปนเปื้อนได้

จากการศึกษาสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับถังหมักพบว่ามีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับอนุภาคดินได้ดีกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับขวดเขย่า และมีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับอนุภาคดินได้ดีที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความสามารถลดลงที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการกระจายตัวที่ไม่สมบูรณ์ของสารก่อการจับกลุ่ม ทำ

ให้อนุภาคดินที่อยู่รอบๆสารก่อการจับกลุ่มเท่านั้นที่จะเกิดการจับกลุ่มกันได้ ดังนั้นอนุภาคดินอื่นๆ จะไม่เกิดการจับกลุ่ม (Yokoi และคณะ, 1997) และจากงานวิจัยของ Freitas และคณะ (2011) ได้รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter* strain A47 DSM23139 มีสมบัติในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับอนุภาคดินได้ดี สามารถประยุกต์ใช้ในด้านการบำบัดน้ำเสีย จึงสามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดในอาหารเหลวสูตรปรับปรุงซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ภายใต้สภาวะการผลิตที่ควบคุมความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากา ศ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 9.917 กรัมต่อลิตร ในเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าถึง 9 เท่า โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (μ) เท่ากับ 0.1605 กรัมต่อลิตรต่อชั่ วโมง อัตราการใช้น้ำตาลซูโครสจำเพาะ (γ) เท่ากับ 1.9214 กรัมซูโครสต่อลิตรชั่วโมง อัตราการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะ(ρ) เท่ากับ 0.5896 กรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรชั่วโมง ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.0453 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.3060 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีความสามารถในการผลิต เท่ากับ 0.3305 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในงานวิจัยนี้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง โดยใช้เวลาในการผลิตที่สั้น ดังแสดงในตารางที่ 5.1 และเมื่อพิจาณาผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ร่วมกับสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคา ไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ที่พบว่ามีสมบัติที่ดีในหลายๆด้าน ได้แก่ มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง และมีความหนืดสูง นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันจากพืช และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จึงสามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV 1-9 ไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย ทั้งในด้านอุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

แบคทีเรียสายพันธุ์	ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เวลาในการผลิต (ชั่วโมง)	ชนิดของการหมัก	อ้างอิง
Pseudomonas oleovorans	11.82	168	batch	Freitas และคณะ (2010)
Arthrobacter viscosus	10	360	batch	Lopez และคณะ (2003)
Enterobacter cloacae UV1-9	9.91	30	batch	งานวิจัยนี้
Enterobacter A47	7.50	52	fed-batch	Torres และคณะ (2011)
Xanthomonas campestris	6.80	72	batch	Papagianni และคณะ (2001)
Enterobacter cloacae WD7	4.80	72	batch	Prasertsan และคณะ (2008)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ณฤดี อัศวเสรีเลิศ . การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย EN02. ใน งานประชุมวิชาการ ระดับนานาชาติ เรื่อง เคมีบริสุทธิ์และประยุกต์ , หน้า 153-159. 21-23 มกราคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, 2553.

พนิดา เทียมชัยบุตร. 2551. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิมลิน ศิริพัฒนานนท์. 2549. การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* 473 เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์. 2551. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต , ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abbasi, S. and Amiri, S. 2008. Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae*. African Journal of Biotechnology. 7(10) : 1574- 1576.

Andaloussi, S. A., Talbaoui, H., Marczak, R. and Bonaly, R. 1995. Isolation and characterization of extracellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum*. Apply Microbiology Biotechnology. 43 : 995-1000.

Anonymous.1996. Bioproducts: bio-concrete. BioIndustry 13 : 56-57.

Asai, T. 1968. Acetic Acid Bacteria Classification and Biochemistry Activities. Tokyo : Tokyo Press.

Ashiuchi, M., Kamei, T., Baek, D.-H., Shin, S.-Y., Sung, M.-H., Soda, K., Yagi, T. and Misono, H. (2001). "Isolation of Bacillus subtilis (chungkookjang), a poly-gamma-glutamate producer with high genetic competence." Apply. Microbiology. Biotechnology. 57: 764-769.

Ayala-Hernandez, I., Hassan, A., Goff, H, D., Mira de Orduna, R. and Corredig, M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. International Dairy Journal. 18:1109-1118

Bandaiphet, C. and Prasertsan, P. 2006. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, $k_L a$ in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers. 66: 216-228.

Banik, R. M., Santhiagu, A. and Upadhyay. 2007. Optimization of nutrients for gellan gum production *by Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. Bioresource Technology. 98:792-797.

Baird, J. K. 1989. Xanthan. Encyclopedia of Polymer Science Engineering 17 : 901-918.

Behravan, J., Bazzaz, B. S. F. and Salimi, Z. 2003. Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. Biotechnology Apply Biochemistry. 38:267-269.

BeMiller, J. N. and Whistler, R. L. 1996. Carbohydrate. *In* O. R. Fennema (ed.), Food Chemistry, pp. 157-223, 3rd. New York: Marcel Dekker.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-binding. Analytical Biochemistry 72 : 248-254.

Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J. and Moineau, S. (2003). "Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review." Journal Dairy Science 86(2): 407-23.

Bromfield, S. M. 1954. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. General Microbiology. 11:1-6.

Bueno, S. M. and Garcia-Cruz, C. H. 2006. Optimization of polysaccharides production by bacteria isolated from soil. Brazilian Journal of Microbiology. 37:296-301.

Castillo, M.L. Ramirez and Uribelarrea, J.L. 2004. Improved process for exopolysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* sp. *Pneumoniae* by a fed-batch strategy. Biotechnology Letters. 26: 1301-1306.

Celik, G. Y., Aslim, B. and Beyatli, Y. 2008. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. Carbohydrate Polymers. 73:178–182

Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review. 97:113-130.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, J. M. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from the slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. Journal dairy science 75: 692-699.

Chaplin, M. (2008). "Curdlan." Retrieved 1 September, 2008, from www.lsbu.ac.uk/water/images/curdlan.gif.

Chenu, C. 1993. Clay- or sand-polysaccharide associations as models for the interface between micro-organismsand soil : water related properties and microstructure. Geoderma. 56 : 143-156.

Chillingarian, G.V. and Vorabutr, P. 1983. Water-base muds. In Chillingarian, G.V. and Vorabutr, P. (ed.), Drilling and Drilling Fluids. Developments in Petroleum Science, pp. 295–344. Amsterdam : Elsevier.

Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. 1987. Surface active agents of two Bacillus species. Applied and Environmental Microbiology 53 : 224-229.

Dearfield, K. L. and Abermathy, C. O. 1988. Acrylamide: its metabolism developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. Mutation Research 195 : 45-77.

Dermlim, W., Prasertsan, P. and Doelle, H. 1999. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 52: 698-703.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 : 350-356.

El-Tayeb, T.S. and Khodair, T.A. 2007. Production and Purification of a Bioemulsifier and Flocculating Agent Produced by *Pseudomonas* sp. UBF 2. Journal of Applied Sciences Research. 3(11): 1564-1570.

Fan, L., Soccol, A.T., Pandey, A., and Soccol, C.R. 2007. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. LWT-Food Science and Technology. 40 : 30-35.

Fijan, R., Sostar-Turk, S. and Lapasin, R. 2007. Rheological study of interactions between non-ionic surfactants and polysaccharide thickeners used in textile printing. Carbohydrate Polymers. 68 : 708-717.

Freitas, F., Alves, V.D., Torres, C..A.V., Cruz, M., Sousa, I., Melo, M.J., Ramos, A.M. and Reis, M.A.M. 2011. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. Carbohydrate polymers. 83 : 159-165.

Fried, J.R. 2000. The solid state properties of polymers. Polymer Science and Technology 2nd ed. pp.132-164. USA : Trentice-Hall Inc.

Fodje, A.M.L., Leeman, M., Wahlund, K.G., Nyman, M., Oste, R. and Larsson, H. 2007. Molar mass and rheological characterisation of an exopolysaccharide from *Pediococcus damnosus* 2.6. Carbohydrate Polymers. 68 : 577-586.

Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A. and Gomez, E. 2000. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. Biotechnology Advances. 18 : 549-579.

Gooch, J.W. 1997. Analysis and Deformulation of Polymeric Materials : paints, plastics, adhesives, and inks. New York : Plenum Press.

Gorret, N., Maubois, J.L., Engasser, J.M. and Ghoul, M. 2001. Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacteiium acidi-propoinici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. Apply Microbiology. 90 : 788-796.

Hatakeyama, T. and Quinn, F.X. 1999. Thermal Analysis : Fundamentals and Applications to Polymer Science, 2nd ed. England : John Wiley and Sons.

He, N., Li, Y. and Chen, J. 2004. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum*. Bioresource Technology 94 : 99-105.

Hoppensack, A., Oppermann-Sanio, B. F. and Steinbuchel, A. (2003). "Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of Bacillus licheniformis." FEMS Microbiology Letters. 218: 39-45.

Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y. and Liu, Z. 2010. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. Chemosphere. 80 : 951-956.

Jang, J. H., Ike, M., Kim, S. M. and Fujita, M. 2001. Production of a novel bioflocculant by fed-batch culture of *Citrobacter* sp. Biotechnology Letters 23 : 593–597.

Jin, H., Lee, N. K., Shin, M. K., Kimc, S. K., Kaplan, D. L. and Lee, J. W. (2003). "Production of gellan gum by Sphingomonas paucimobilis NK2000 with soybean pomace." Biochemical Engineering Journal. 16: 357–360.

Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., and Tommonaro, G. 2009. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. Carbohydrate Polymers 77 : 338–343.

Kang, K. S. and Veeder, G. T. 1982. Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its preparation. US.

Kang, K. S., Veder, G. T. and Cottrell, I. W. (1983). "Some novel bacterial polysaccharides." Progress in Industrial Microbiology. 18: 231-253.

Kim, D., Robyt, J. F., Lee, S., Lee, J. and Kim, Y. M. 2003. Dextran molecular size and degree of brancing as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. Carbohydrate Research. 338:1183-1189.

Kodali, V.P., Das, S. and Sen, R. 2009. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. Food Research International 42 : 695-699.

Kumar G. C., Joo, H. S., Choi, J. W., Koo, J. M. and Chang, C. S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. Enzyme and Microbial Technology. 34:673–681.

Kurane, R. and Nohata, Y. 1991. Microbial flocculation of waste liquids and oil emulsions by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. Agricultural and Biological Chemistry 55 : 1127-1129.

Kurane, R., Toeda, K., Takeda, K. and Suzuki, T. 1986. Culture Conditions for Production of Microbial Flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. Agricultural and biological chemistry 50 : 2309-2313.

Kwon, G. S., Moon, S. H., Hong, S. D., Lee, H. M., Kim, H. S. and Oh, H. M. (1996). "A novel flocculant biopolymer produced by Pestalotiopsis sp. KCTC 8637P." Biotechnology Letters. 18(12): 1459–1464.

Laws, A.P., and Marshall, V.M. 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy* Journal 11 : 709-721.

Levin, S. and Friesen, W.T. 1987. Flocculation of colloid particles by water soluble polymers. In Attia, Y.A. (ed.), Flocculation in biotechnology and separation systems, pp. 3-20. Amsterdam : Elsevier.

Levy, N., Magdasi, S. and Bar-Or, Y. 1992. Physico-chemical aspects in flocculation of bentonite suspensions by a cyanobacterial. Water Res 26 : 49-54.

Lin, T.Y., and Chien, M.F.C. 2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. Food Chemistry 100 : 1419-1423.

Lindsay, S. 1991. High Performance Liquid Chromatography : Analytical chemistry by open learning. Singapore : John Wiley and Sons.

Linton, J. D., Ash, S. G. and Huybrechts (1991). Microbial polysaccharides. New York.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z. and Zeng, X. 2009. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Carbohydrate Polymers 78 : 275-281.

Lopez, Elena, Ramos, Israel and Sanroman, M Angeles. 2003. Extracellular polysaccharide production by *Arthrobacter viscosus*. Journal of Food Engineering. 60: 463-467.

Lu, W. Y., Zhang, T., Zhang, D. Y., Li, C. H., Wen, J. P. and Du, L. X. 2005. A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defecating the trona suspension. Biochemical Engineering Journal 27 : 1-7.

Madiedo, P. Ruas, and Gavilan, C.G. de los Reyes. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharide Produced by Lactic Acid Bacteria. J. Dairy Science. 88: 843-856.

Mata, J.A., Jar, V.Be., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C., Quesada, E. and Llamas, I. 2008. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. Journal of Applied Microbiology. 105: 521–528.

Mandala, I. G., Savvas, T. P. and Kostaropoulos, A. E. 2004. Xanthan and locust bean gum influence on the rheology and structure of a white model-sauce. Journal of Food Engineering 64 : 335-342.

Margaritis, A. and Pace, P. W. 1985. Microbial Polysaccharide. *In* M. Moo Young (ed.), Comprehensive Biotechnology, 1st ed., vol.3. New York: Pergamon Press.

Martin, L. O., Fialho, A. M., Rodrigues, P. L. and Sa-Correia, I. 1996. Gellan gum production and activity of biosynthetic enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* mucoid and non-mucoid variants. Biotechnology and Applied Biochemistry 24 : 47–54.

Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. Journal Fermentation Bioengineering. 75(1):18-22.

McNeely, W. 1967. Biosynthetic polysaccharides. In Peppler, H.J. (ed.). Microbial technology pp. 381-402. New York : Reinhold Press Ltd.

Mokaddem, H., Sadaoui, Z., Boukhelata, N., Azouaou, N. and Kaci, Y. 2009. Removal of Cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. Journal of Hazardous Materials. 172 : 1150-1155.

Monica, M. 2003. Microbial polysaccharides. Production, characterization and properties. *In* Food Technology, pp.26-38. Romania: Lucian Blaga University of Sibiu.

Moon, S.H., Park, C.S., Kim, Y.J. and Park, Y.I. 2006. Biosorption isotherms of Pb (II) and Zn (II) on Pestan, an extracellular polysaccharide, of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. Process Biochemistry. 41 : 312-316.

Noda, S., and others. 2008. Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems. 1. Gellan gum with various acyl contents in the presence and absence of potassium. Food Hydrocolloids. 22 :1148-1159.

Paradise, C. (2007). Retrieved 1 September, 2008, from http://www.bio.davidson.edu/.

Park, M. R., Ryu, H. J., Kim, D., Choe, J. Y. and Robyt, J. F. 2001. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextransucrase expressed in Escherichia coli. Journal of Microbiology and Biotechnology. 11 : 628-635.

Pharmacosmos. (2006). Retrieved 1 September, 2008, from http://www.dextran.net.

Prasertsan, P., Dermlim, W., Doelle, H. and Kennedy, J. F. 2006. Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers. 66:289–297.

Prasertsan, P., Wichienchot, S., Doelle, H. and Kennedy, J. F. 2008. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers. 71: 468-475.

Pual, A. S. 1979. A Survey of Possible New Polysaccharide. *In* J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell. (eds.), Polysaccharide in Food. London: Butterworth.

Paul, F., Morin, A., and Monsan, P. 1986. Microbial polysaccharides with actual potential industrial application. Advanced Biotechnology 4 : 245-259.

Renaud, M., Belgacem, M.N. and Rinaudo, M. 2005. Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions. Polymer 46 : 12348-12358.

Rinaudo, M. and Milas, M. 1978. Polyelectrolyte behaviour of a bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: comparison with carboxymethylcellulose. Biopolymers 17 : 2663-2678.

Roberts, I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. Microbiology. 50:285–315.

Roseiro, J. C. 1992. Medium development for xanthan production. Process Biochemistry. 27(3):167–175.

Salehizadeh, H., and Shojaosadati, S.A. 2001. Biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. Biotechnology Advances 19 : 371-385.

Salehizadeh, H. and Shojaosadati, S. A. 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced form *Bacillus firmus*. Water Research 37 : 4231-4235.

Sanchez-Medina, I., Gerwig, G. J., Urshev, L. Z. and Kamerling, J. P. 2007. Structure of a neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB.B26. Carbohydrate Research. 342:2430–2439.

Sandford, P.A. 1979. A survey of possible new polysaccharides. In: Blanshard, J.M.V. and Mitchell, J.R. (eds). Polysaccharides in Food pp. 251-262 London : Butterworths.

Shimada, A., Nakata, H., and Nakamura, I. 1997. Acidic Exopolysaccharide Produced by *Enterobacter* sp. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84 : 113-118.

Skoog, D.A., West, D.M. and Holler F.J. 1988. Analytical Chemistry, 5th ed. The United States of America : Saunders College.

Shu, C. H. and Yang, S. T. 1990. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. Biotechnology Bioengineerinc. 35:454–468.

Souw, P. and Demain, A. L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Applied Environmental Microbioogy. 37:1186-1192.

Sloneker, J. H., Orentas, D. G., Knutsen, C. A., Watson, P. R. and Jeanes, A. (1968). "Structure of the extracellular bacterial polysaccharide from A. viscosus " Canadian Journal of Chemistry. 46: 3353-3360.

Suh, H. H., Kwon, G. S., Lee, C. H., Kim, S. H., Oh, H. M. and Yoon, B. D. 1997. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. Journal of Fermentation and Bioengineering 84 : 108-112.

Sutherland, I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharide New York : Cambridge University Press.

Sutherland, I. W. 1977. Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. In Bacterial exopolysaccharides-their nature and production, pp. 27-96. New York: Academic Press.

Tako, M., Nakamura, S. and Nagahama, T. 1982. Studies on the Application of Polysaccharide Produced by Coryneform Bacteria Strain C-81. Physical properties of sweet bean jelly containing the polysaccharide as a stabilizing agent. Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of the Ryukyus 29 : 79-86.

Tong, H., and others. 2009. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of Pleurotus ostreatus. Bioresource Technology 100 : 1682–1686.

Tallgren, A. H., Airaksinen, U., Weissenberg, R. V., Ojamo, H., Kuusisto, J. and Leisola, M. 1998. Exopolysaccharide-Producing Bacteria from Sugar Beets. Applied and environmental Microbiology. 65:862–864.

Torres, A.V., Marques, R., Antunes, S., Alves, V.D., Sousa, I., Ramos, A.M., Oliveira, R., Freitas, F. and Reis, A.M. 2011. Kinetics of production and characterization of the fucose-containing exopolysaccharide from *Enterobacter* A47. Journal of Biotechnology

Triveni, R., Shamala, T. R. and Rastogi, N. K. 2001 . Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from Agrobacterium radiobacter. Process Biochemistry. 36: 787–795.

Ueda, S., Momii, F., Osajima, K. and Ito, K. 1981. Extracellular polysaccharide produced by strain No.626 of *Aeromonas hydrophila*. Agricultural and biological chemistry 45 :1977-1981.

Velasco, S., and others. 2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. Food Microbiology. 111 : 252-258.

Vinarta, S.C., Francois, N.J., Daraio, M.E., Figueroa, L.I.C. and Farina, J.I. 2007. *Sclerotium rolfsii* scleroglucan: The promising behavior of a natural polysaccharide as a drug delivery vehicle, suspension stabilizer and emulsifier. International Journal of Biological Macromolecules. 41 : 314-323.

Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., and Song, S. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. International Journal of Biological Macromolecules 43 : 283-288

Williams, A.G., and Wimpenny, J.W.T. 1978. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCB11264 grown in continuous culture. Journal of General Microbiology. 104 : 47.

Willumsen, P. A. E. and Karlson, U. 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation 7 : 415-423.

Ying, C., Liping, S., Yong, Z., Lei, W. and Liguo, A. 2006. The production-influencing factors of extracellular polysaccharide (EPS) from a strain of lactic acid bacteria and EPS extraction. Frontiers of Biology in China. 3 : 236-240.

Yokoi, H., Yoshida, T., Mori, S., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y.1997. Biopolymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp. Biotechnology Letters. 19 : 569-573.

Yoo, J. and Chnng, D. 1989. Isolation of a polysaccharide producing bacterium and properties of its polysaccharide. Journal Korean chemical society. 32: 303-308.

Yoo, J., Koo, Y., Shin, D. and Chung, D. 1989. Cultural condition of Enterobacter agglornerans U-I for polysaccharide production. J. Korean Agric. Chem. Soc. 32: 309-314.

Yun, U. J. and Park, H. D. 2003. Physical properties of an extracellular polysaccharide produced by *Bacillus* sp. CP912. Applied Microbiology. 36:282-287.

Zamora, F., Gonzalez, M.C., Duenas, M.T., Irastorza, A., Velasco, S. and Ibarburu, I. 2002. Thermodegradation and thermal transitions of an exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. Journal of Macromolecular Science 41 : 473-486.

Zohuriaan, M.J. and Shokrolahi, F. 2004. Thermal studies on natural and modified gums. Polymer Testing. 23 : 575-579.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่ดัดแปลงสูตรจาก Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)

ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	1.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ	7.0	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่ดัดแปลงสูตรจาก Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)

ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	1.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ	7.0	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรจากสูตรของสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่ดัดแปลงสูตรจาก Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)

ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ	7.0	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง

1. **กลีเซอรอล** 10 %

เตรียมโดยนำกลีเซอรอล 87 % ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 88.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **สารละลาย** Coomassie blue

เตรียมโดย ชั่ง Coomassie blue G250 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนจนละลายให้หมด แล้วจึงเติมกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร เป็น 1000 มิลลิลิตร

3. **สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก** (DNSA reagent)

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ละลายบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hotplate Stirrer) เติมโปแทสเซียมตาร์เตรต 30 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

4. **สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์** (KCl 2 M)

เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 150 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. **สารละลาย** Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

เตรียมโดยละลายเกลือของ EDTA ไดโซเดียม (EDTA disodium salt) 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

6. **สารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์รีเอเจนท์**

เตรียมโดยละลายฟีนอล 7 กรัมและโซเดียมไนโตรพัสซายด์ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. **สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์รีเอเจนต์**

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมไดโซเดียมโมโนไฮโดเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (5-5.25%) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

8. **สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์** (0.85% NaCl)

เตรียมโดยละลาย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. **สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลล่าร์** (NaOH 1 M)

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.844 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลล่าร์ (HCl 2 M)

เตรียมโดยเติมน้ำกลั่นปลอดประจุไปปริมาตรหนึ่ง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ลงไป 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

11. สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

กรดซัลฟูริกความเข้มข้น (conc. H_2SO_4)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

12. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.004	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

13. สารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์

Cetylpyridinium Chloride (CPC)	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

14. Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

Disodium phosphate	13.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

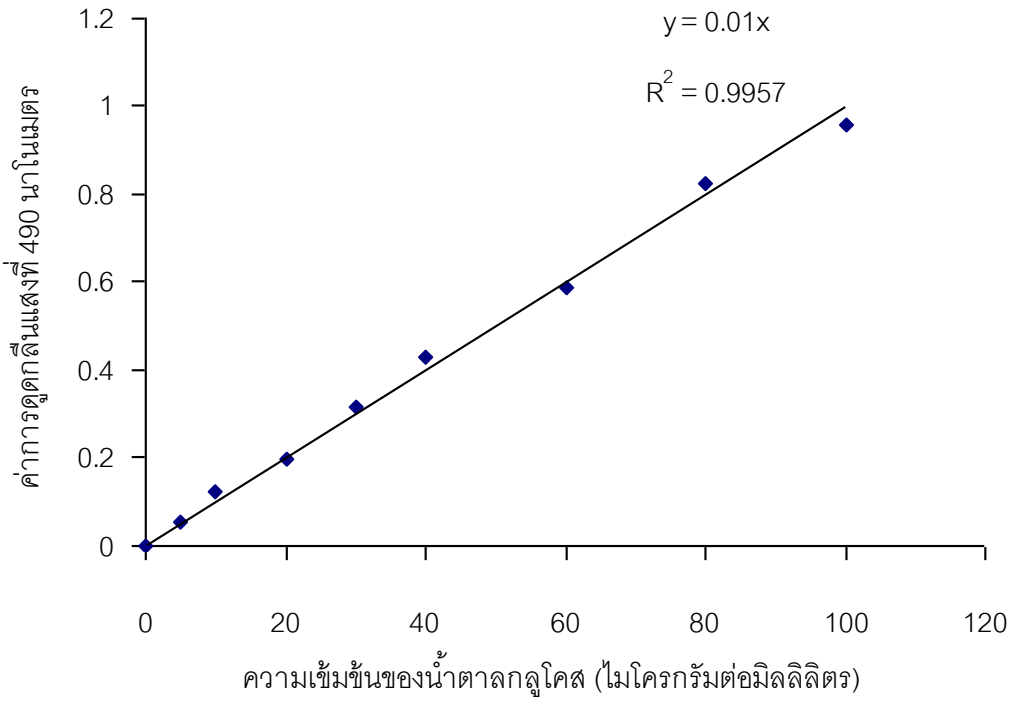
15. สารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์

ฟีนอล	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

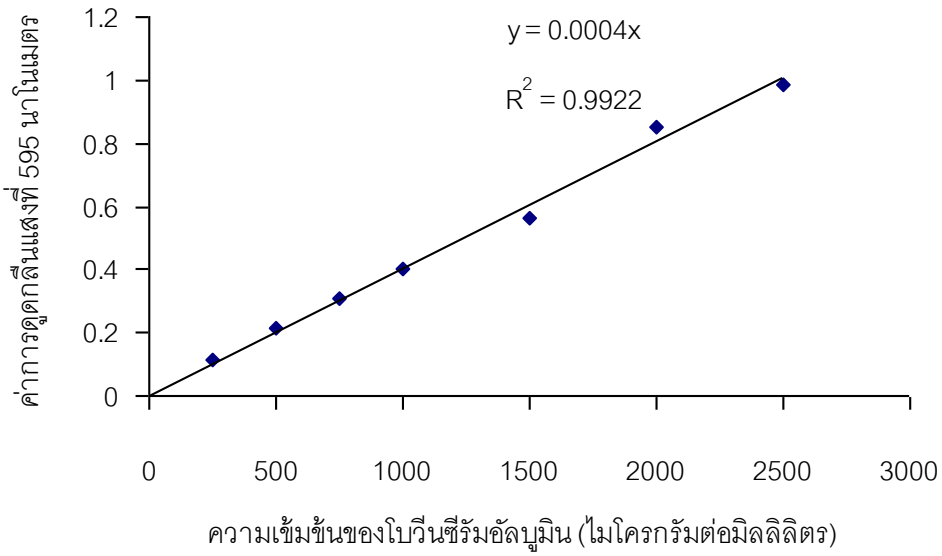
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois **และคณะ**, 1956)



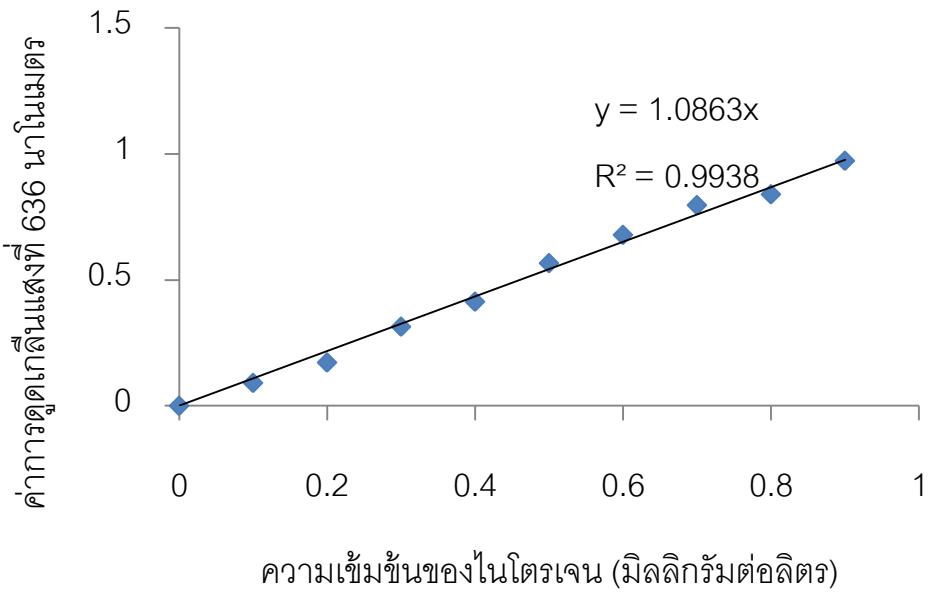
กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. **กราฟมาตรฐานโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** Protein Dye Binding (Bradford, 1976)



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. กราฟมาตรฐานไนโตรเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Kemper (1974)



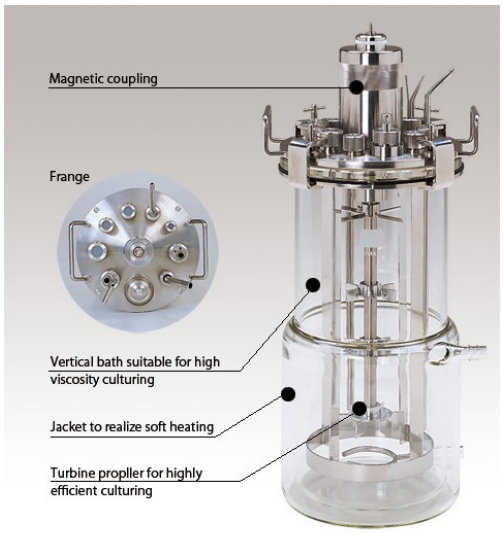
กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร กับปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนความเข้มข้น 0-0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ง

ข้อมูลเกี่ยวกับถังหมัก

www.eyela.com

ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME บริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น



www.eyela.com

องค์ประกอบภายในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME บริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น

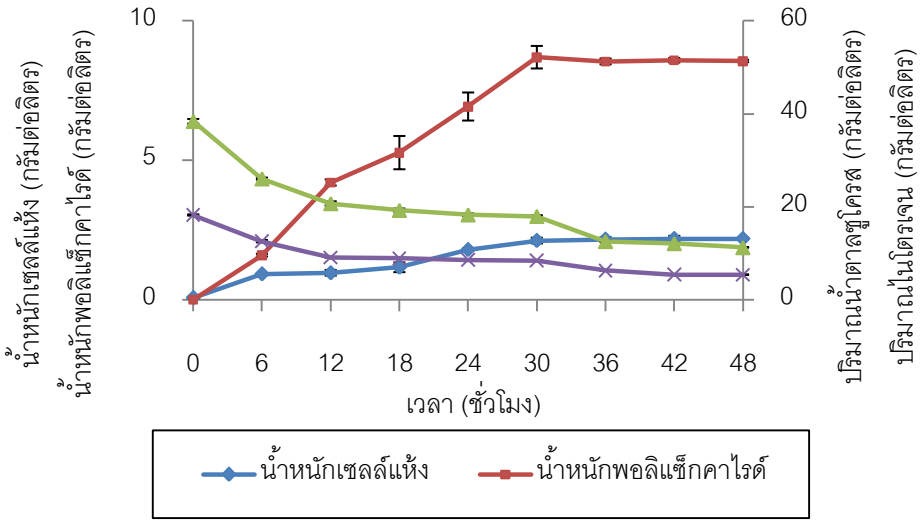
รายละเอียดของถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME บริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น

ตัวถังหมัก (Vessel)	: ทำจากแก้วหนา 2 ชั้น
การหมุนแกนใบพัด (Drive shaft)	: พลังงานแม่เหล็ก (Magnetically coupled drive)
ช่วงการควบคุมอุณหภูมิ	: ควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำหล่อเย็น ในช่วง 5 ถึง 60 องศาเซลเซียส
ช่วงความเร็วใบพัด	: 80-800 รอบต่อนาที
การตั้งค่าอุณหภูมิ	: volume setting
ฮีตเตอร์	: 300 วัตต์
มอเตอร์ใบพัด	: 40 วัตต์
ชนิดใบพัด (Impeller)	: Turbine
ขนาดถังหมัก (มม.)	: 300 W x 470D x 865H
น้ำหนักรวม	: 35 กิโลกรัม

ภาคผนวก จ

ตารางที่ 1 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5

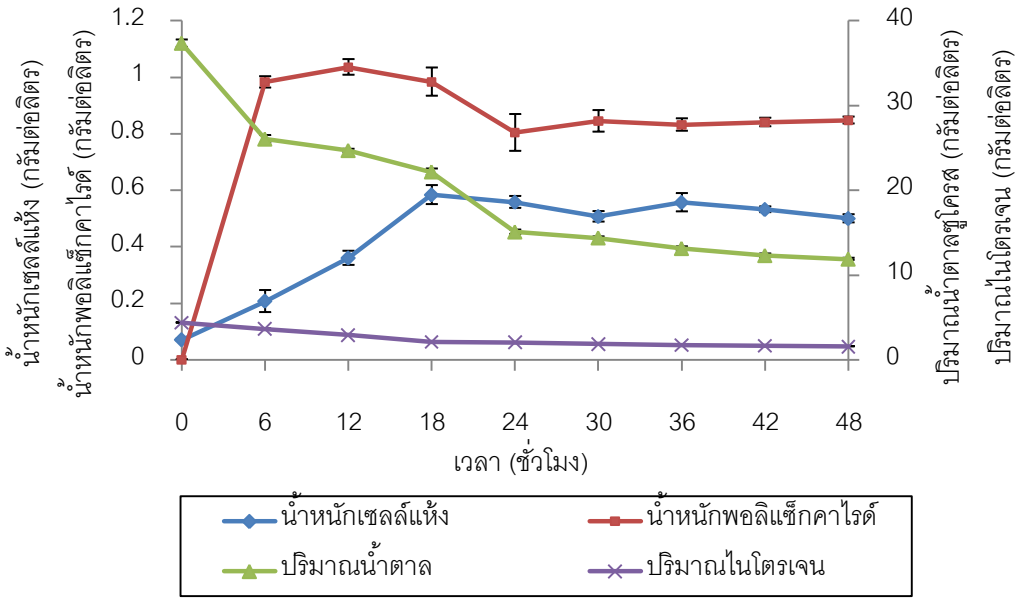
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.079±0.01	0.000±0.00	38.366±0.50	18.211±0.14
6	0.926±0.02	1.596±0.04	26.033±0.22	12.580±0.25
12	0.964±0.10	4.202±0.11	20.700±0.45	9.098±0.02
18	1.162±0.17	5.271±0.59	19.250±0.36	8.938±0.00
24	1.794±0.04	6.924±0.50	18.283±0.28	8.591±0.01
30	2.119±0.10	8.692±0.40	17.966±0.20	8.475±0.01
36	2.165±0.07	8.540±0.10	12.566±0.12	6.284±0.01
42	2.188±0.10	8.582±0.08	12.116±0.10	5.455±0.01
48	2.187±0.03	8.555±0.04	11.250±0.05	5.385±0.04



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5

ตารางที่ 2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20

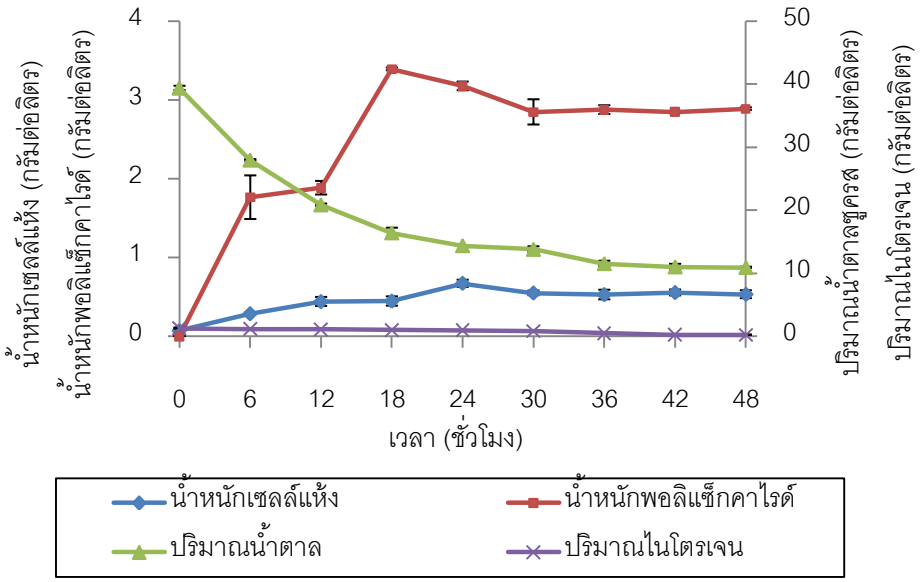
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.070±0.00	0.000±0.00	37.333±0.43	4.372±0.03
6	0.207±0.03	0.983±0.02	26.033±0.46	3.639±0.01
12	0.360±0.02	1.036±0.02	24.683±0.18	2.905±0.02
18	0.584±0.03	0.984±0.04	22.166±0.37	2.101±0.03
24	0.558±0.02	0.804±0.06	15.083±0.25	2.062±0.00
30	0.507±0.01	0.845±0.03	14.383±0.15	1.871±0.02
36	0.557±0.03	0.832±0.02	13.133±0.22	1.721±0.03
42	0.532±0.01	0.841±0.01	12.300±0.21	1.653±0.02
48	0.500±0.01	0.848±0.01	11.883±0.12	1.568±0.01



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20

ตารางที่ 3 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60

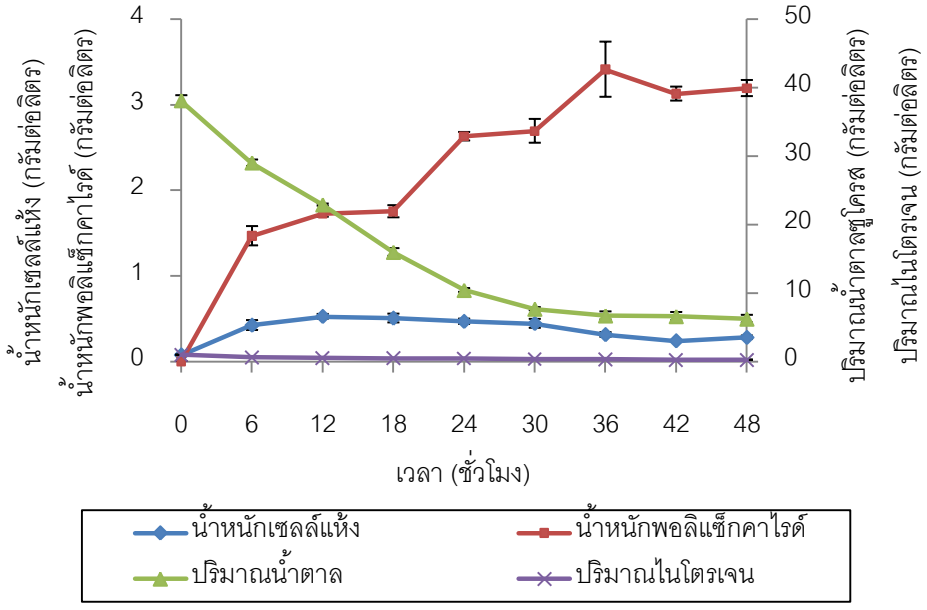
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.074±0.01	0.000±0.00	39.366±0.34	1.282±0.08
6	0.288±0.01	1.763±0.27	27.950±0.13	1.162±0.01
12	0.440±0.05	1.883±0.08	20.850±0.18	1.126±0.01
18	0.446±0.05	3.391±0.01	16.416±0.78	1.032±0.02
24	0.670±0.04	3.175±0.05	14.383±0.02	0.972±0.03
30	0.549±0.02	2.845±0.16	13.800±0.44	0.846±0.02
36	0.528±0.06	2.874±0.05	11.533±0.42	0.487±0.02
42	0.554±0.03	2.848±0.01	11.016±0.45	0.253±0.00
48	0.532±0.05	2.887±0.01	10.916±0.10	0.230±0.00



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60

ตารางที่ 4 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100

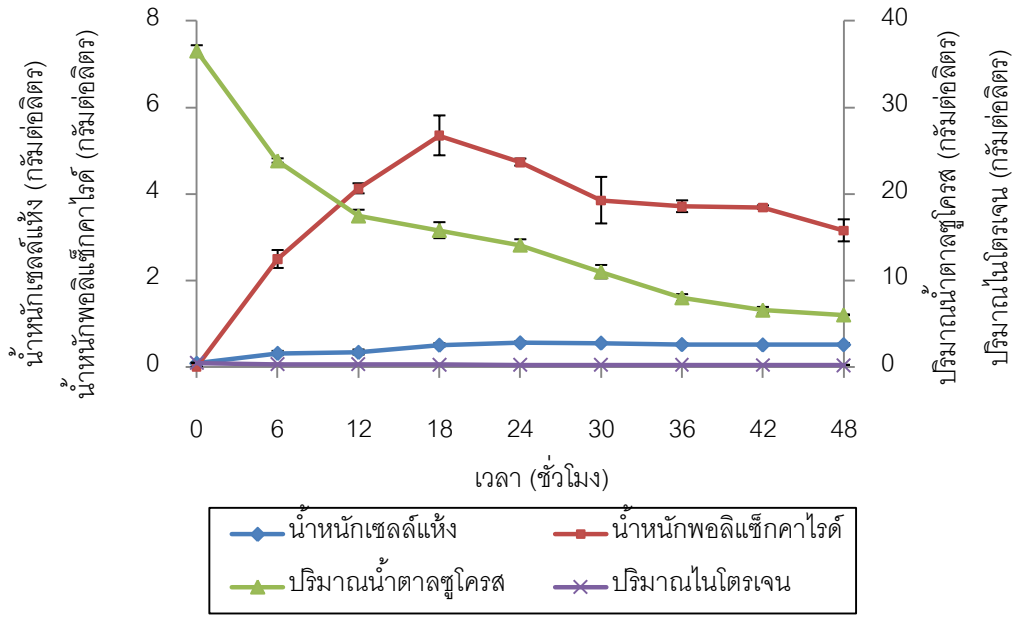
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.075±0.00	0.000±0.00	38.050±0.80	0.948±0.04
6	0.422±0.05	1.466±0.11	28.983±0.47	0.593±0.05
12	0.524±0.02	1.724±0.03	22.865±0.16	0.496±0.01
18	0.504±0.05	1.852±0.07	15.950±0.56	0.458±0.01
24	0.466±0.03	2.629±0.04	10.400±0.27	0.427±0.01
30	0.442±0.05	2.692±0.13	7.666±0.22	0.334±0.02
36	0.312±0.02	3.412±0.32	6.683±0.58	0.320±0.06
42	0.240±0.00	3.127±0.08	6.583±0.59	0.220±0.01
48	0.279±0.02	3.192±0.09	6.216±0.55	0.214±0.00



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100

ตารางที่ 5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

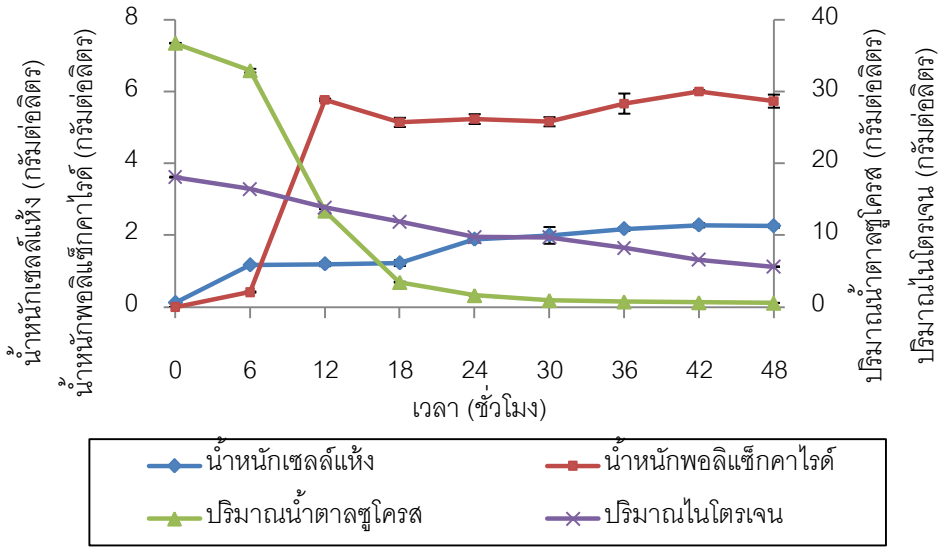
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.075±0.00	0.000±0.00	38.050±0.80	0.948±0.04
6	0.422±0.05	1.466±0.11	28.983±0.47	0.593±0.05
12	0.524±0.02	1.724±0.03	22.865±0.16	0.496±0.01
18	0.504±0.05	1.852±0.07	15.950±0.56	0.458±0.01
24	0.466±0.03	2.629±0.04	10.400±0.27	0.427±0.01
30	0.442±0.05	2.692±0.13	7.666±0.22	0.334±0.02
36	0.312±0.02	3.412±0.32	6.683±0.58	0.320±0.06
42	0.240±0.00	3.127±0.08	6.583±0.59	0.220±0.01
48	0.279±0.02	3.192±0.09	6.216±0.55	0.214±0.00



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

ตารางที่ 6 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และใช้แหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

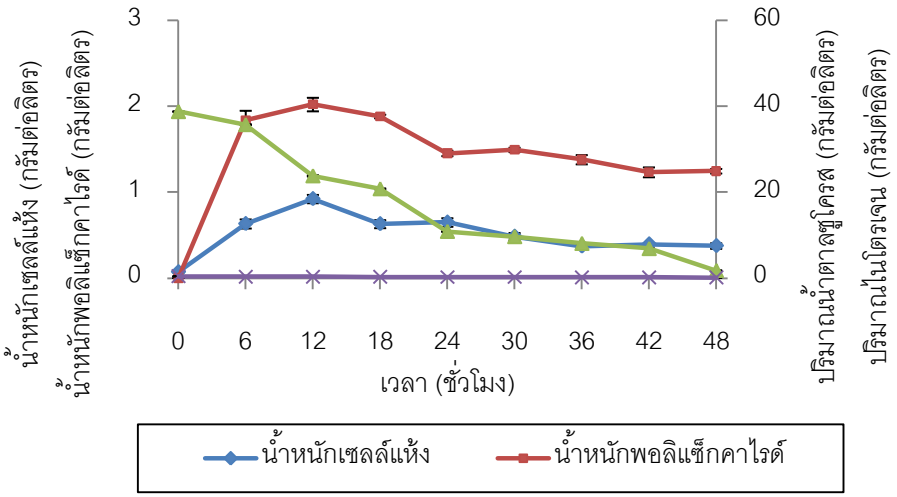
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.115±0.00	0.000±0.00	36.700±0.05	18.073±0.07
6	1.164±0.01	0.414±0.01	32.883±0.25	16.415±0.00
12	1.193±0.05	5.765±0.03	13.366±0.25	13.828±0.01
18	1.220±0.08	5.137±0.12	3.453±0.05	11.858±0.00
24	1.878±0.08	5.229±0.13	1.620±0.03	9.731±0.00
30	1.992±0.23	5.155±0.12	0.925±0.01	9.679±0.00
36	2.170±0.05	5.660±0.28	0.740±0.01	8.205±0.00
42	2.274±0.05	5.999±0.03	0.631±0.00	6.592±0.00
48	2.251±0.04	5.728±0.18	0.563±0.00	5.607±0.00



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และใช้แหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

ตารางที่ 7 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 และใช้แหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] และสารสกัดจาก ยีสต์ (Yeast extract)

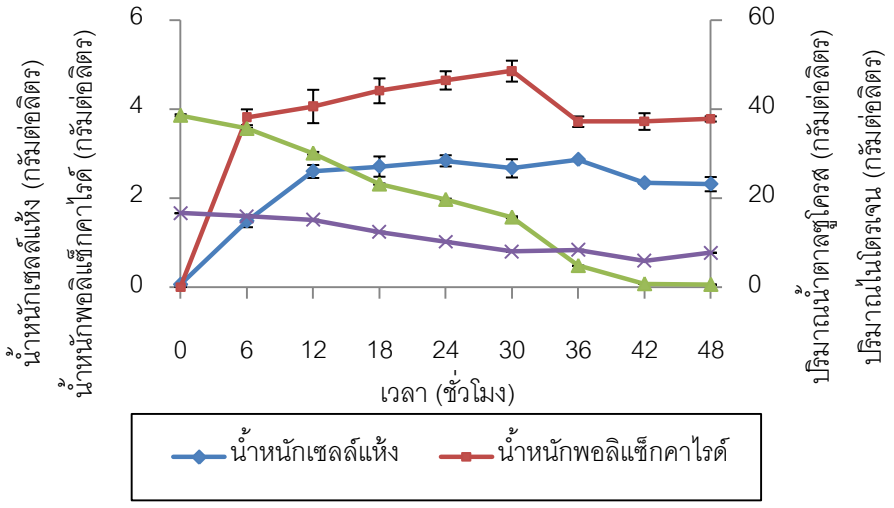
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.071±0.00	0.00±0.00	38.800±0.10	0.450±0.00
6	0.632±0.05	1.835±0.11	35.766±0.10	0.321±0.00
12	0.922±0.04	2.022±0.07	23.833±0.16	0.306±0.00
18	0.630±0.04	1.883±0.02	20.816±0.10	0.254±0.00
24	0.649±0.04	1.453±0.03	10.883±0.10	0.224±0.00
30	0.484±0.04	1.494±0.02	9.666±0.12	0.219±0.00
36	0.369±0.01	1.380±0.05	8.083±0.07	0.192±0.00
42	0.395±0.00	1.233±0.05	6.883±0.07	0.189±0.00
48	0.375±0.03	1.246±0.02	1.783±0.05	0.143±0.00



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 และใช้แหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

ตารางที่ 8 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

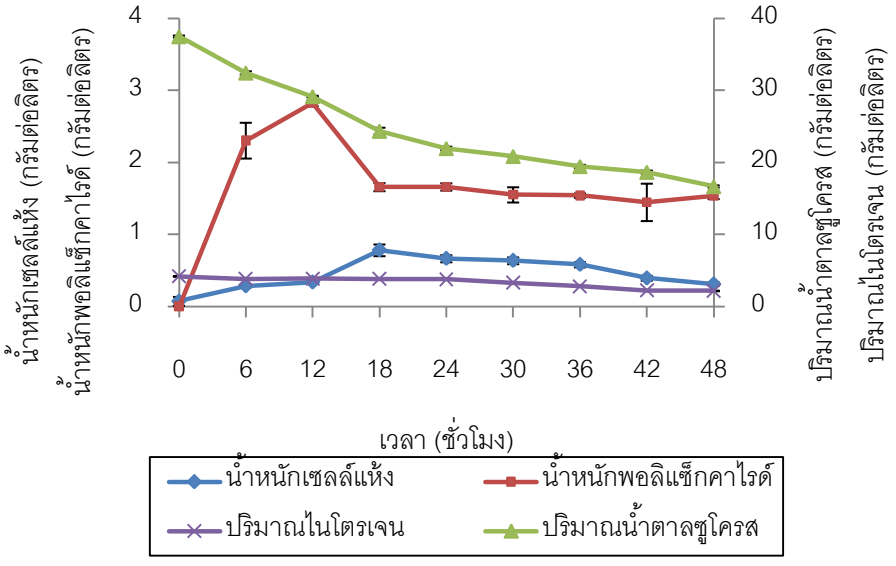
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.064±0.00	0.000±0.00	38.633±0.23	16.649±0.02
6	1.488±0.13	3.820±0.17	35.666±0.16	15.944±0.04
12	2.602±0.14	4.062±0.37	30.133±0.28	15.158±0.04
18	2.712±0.22	4.414±0.27	23.166±0.16	12.421±0.08
24	2.841±0.12	4.648±0.20	19.716±0.20	10.236±0.05
30	2.672±0.20	4.856±0.23	15.750±0.20	8.014±0.05
36	2.866±0.00	3.720±0.11	4.846±0.04	8.383±0.07
42	2.342±0.02	3.724±0.18	0.763±0.02	5.952±0.05
48	2.317±0.16	3.782±0.05	0.606±0.02	7.763±0.02



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

ตารางที่ 9 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เ ท่ากับ 200 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

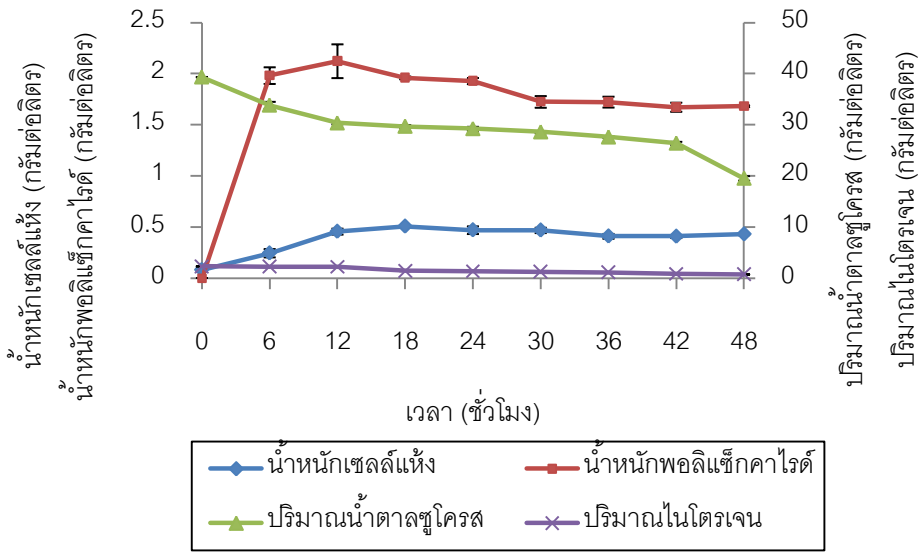
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.072±0.06	0.000±0.00	37.483±0.15	0.418±0.00
6	0.284±0.01	2.303±0.24	32.433±0.23	0.382±0.00
12	0.336±0.01	2.824±0.04	29.166±0.10	0.383±0.00
18	0.780±0.08	1.658±0.05	24.350±0.47	0.380±0.00
24	0.663±0.04	1.660±0.05	21.950±0.25	0.376±0.00
30	0.635±0.04	1.550±0.10	20.850±0.05	0.326±0.00
36	0.580±0.03	1.540±0.03	19.450±0.22	0.279±0.00
42	0.392±0.03	1.446±0.25	18.650±0.22	0.222±0.00
48	0.310±0.02	1.538±0.04	16.660±0.16	0.216±0.00



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ200 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

ตารางที่ 10 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) โดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

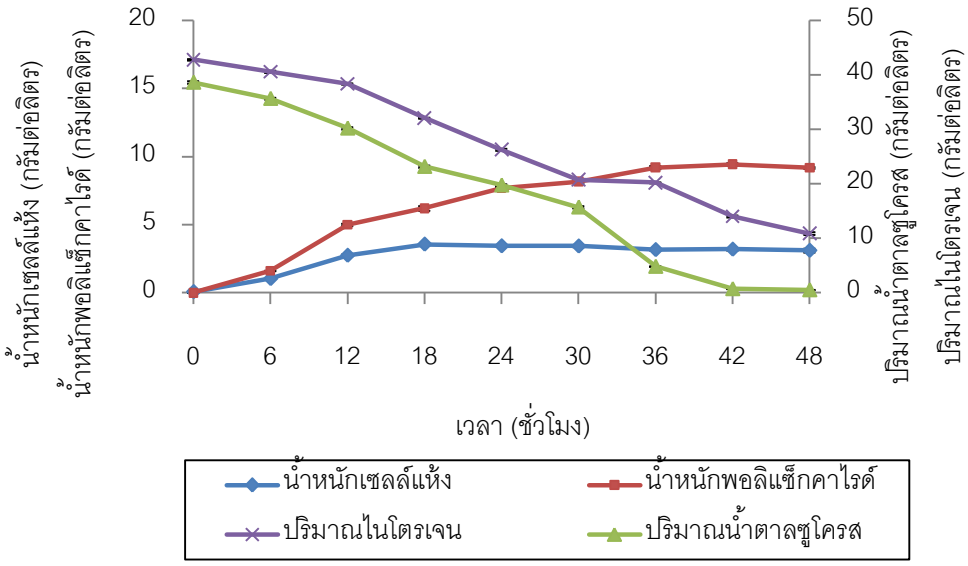
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.084±0.01	0.000±0.00	39.350±0.05	2.362±0.03
6	0.247±0.04	1.983±0.08	33.850±0.68	2.270±0.01
12	0.458±0.02	2.124±0.16	30.366±0.21	2.249±0.02
18	0.508±0.00	2.361±0.01	29.716±0.27	1.454±0.02
24	0.472±0.03	2.444±0.05	29.250±0.40	1.374±0.02
30	0.470±0.02	1.940±0.05	28.616±0.22	1.291±0.02
36	0.412±0.02	1.938±0.05	27.616±0.14	1.141±0.02
42	0.410±0.01	1.734±0.04	26.416±0.30	0.862±0.04
48	0.432±0.00	1.684±0.00	19.566±0.44	0.779±0.03



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) โดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ตารางที่ 11 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

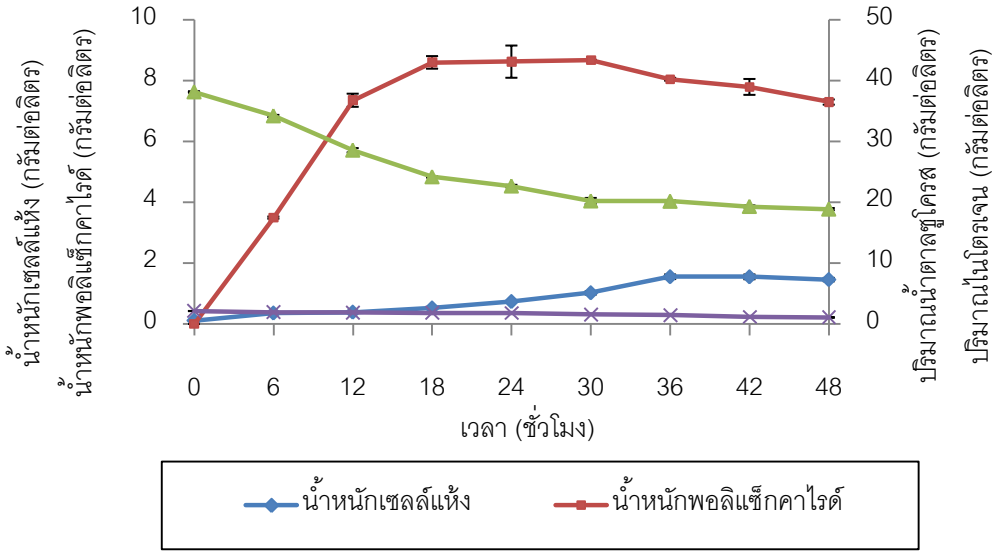
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.076±0.00	0.000±0.00	38.633±0.23	17.116±0.05
6	1.035±0.02	1.615±0.01	35.666±0.16	16.238±0.08
12	2.747±0.07	4.995±0.08	30.216±0.20	15.342±0.04
18	3.566±0.02	6.202±0.17	23.183±0.20	12.832±0.03
24	3.441±0.05	7.684±0.09	19.766±0.17	10.512±0.07
30	3.427±0.06	8.173±0.10	15.733±0.20	8.297±0.03
36	3.163±0.04	9.206±0.11	4.843±0.04	8.082±0.03
42	3.195±0.08	9.432±0.09	0.740±0.03	5.615±0.07
48	3.111±0.14	9.181±0.06	0.540±0.02	4.363±0.10



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

ตารางที่ 12 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

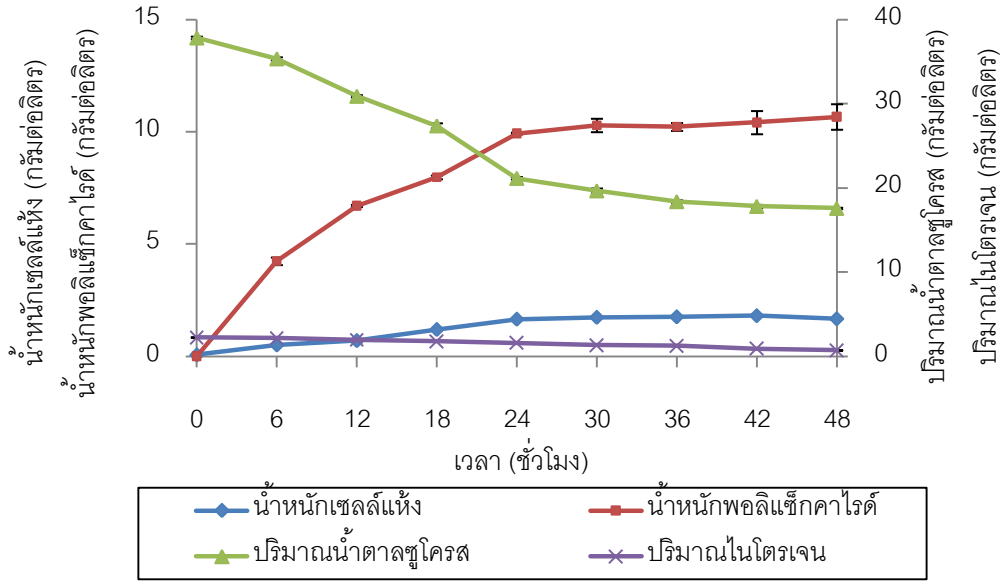
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.111±0.00	0.000±0.00	38.116±0.12	0.427±0.00
6	0.356±0.02	3.496±0.03	34.183±0.17	0.390±0.00
12	0.385±0.00	7.352±0.21	28.550±0.35	0.380±0.00
18	0.522±0.02	8.595±0.12	24.183±0.12	0.371±0.00
24	0.735±0.00	8.620±0.11	22.666±0.20	0.363±0.00
30	1.024±0.05	8.670±0.19	20.216±0.50	0.316±0.00
36	1.553±0.07	8.043±0.04	20.166±0.16	0.288±0.00
42	1.550±0.07	7.790±0.26	19.316±0.17	0.234±0.00
48	1.460±0.05	7.292±0.08	18.883±0.17	0.216±0.00



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 และใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

ตารางที่ 13 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มี แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) โดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

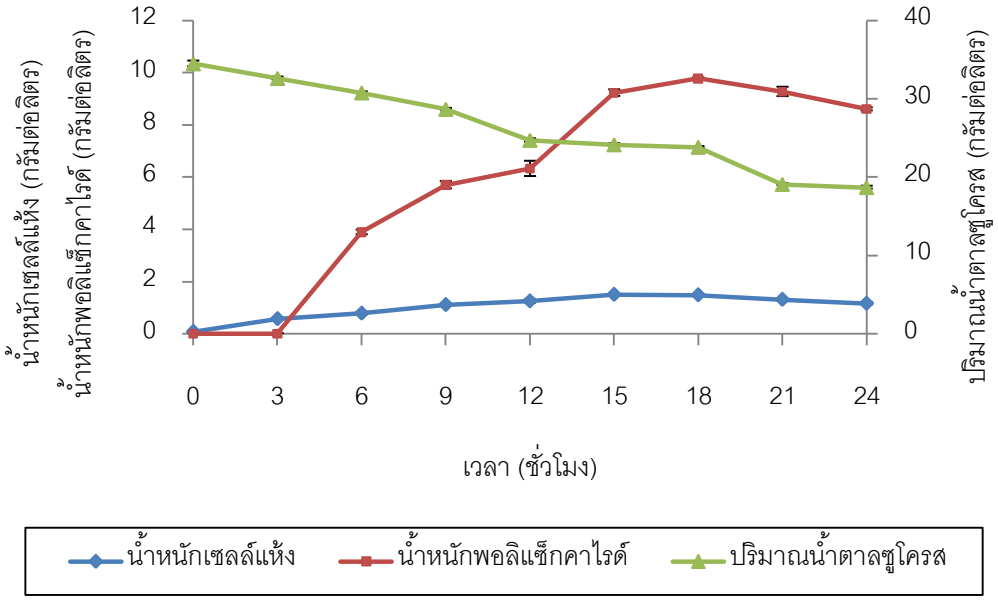
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
0	0.064±0.00	0.000±0.00	37.833±0.15	2.240±0.01
6	0.505±0.04	4.235±0.16	35.350±0.18	2.141±0.02
12	0.700±0.07	6.702±0.04	30.900±0.13	1.939±0.02
18	1.195±0.03	7.973±0.08	27.383±0.30	1.773±0.02
24	1.653±0.04	9.927±0.14	21.150±0.15	1.592±0.02
30	1.736±0.03	10.288±0.18	19.666±0.28	1.325±0.02
36	1.758±0.09	10.223±0.02	18.383±0.16	1.251±0.04
42	1.808±0.01	10.414±0.42	17.816±0.10	0.892±0.05
48	1.671±0.01	10.666±0.61	17.583±0.30	0.705±0.03



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) โดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ตารางที่ 14 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 vvm

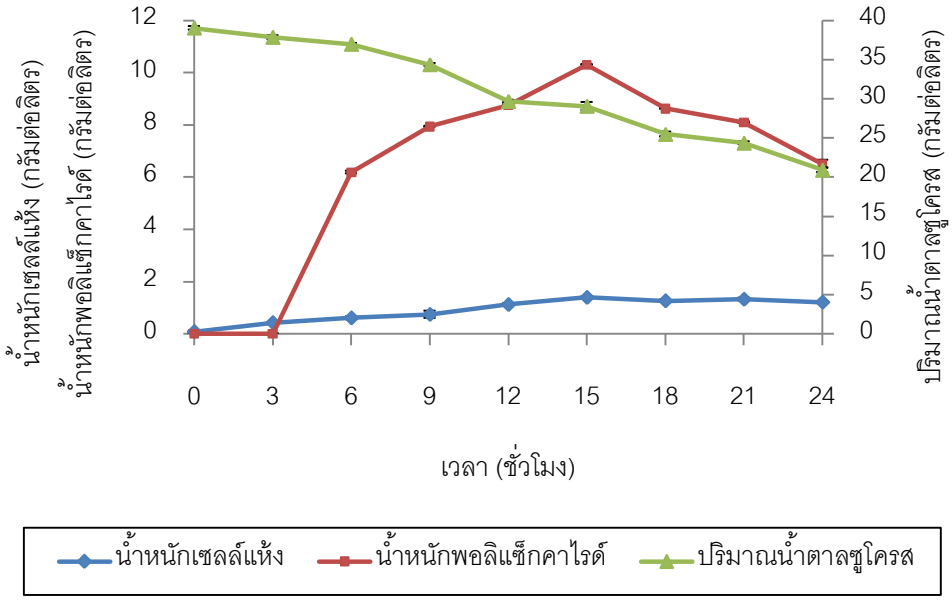
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.087±0.01	0.0000±0.00	34.500±0.35
3	0.575±0.02	0.000±0.00	32.633±0.17
6	0.784±0.04	3.891±0.08	30.783±0.12
9	1.110±0.02	5.700±0.14	28.683±0.12
12	1.251±0.06	6.325±0.29	24.716±0.20
15	1.501±0.02	9.227±0.12	24.150±0.15
18	1.483±0.01	9.780±0.03	23.833±0.10
21	1.311±0.02	9.273±0.17	19.083±0.10
24	1.161±0.05	9.272±0.18	18.683±0.18



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 vvm

ตารางที่ 15 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 2 vvm

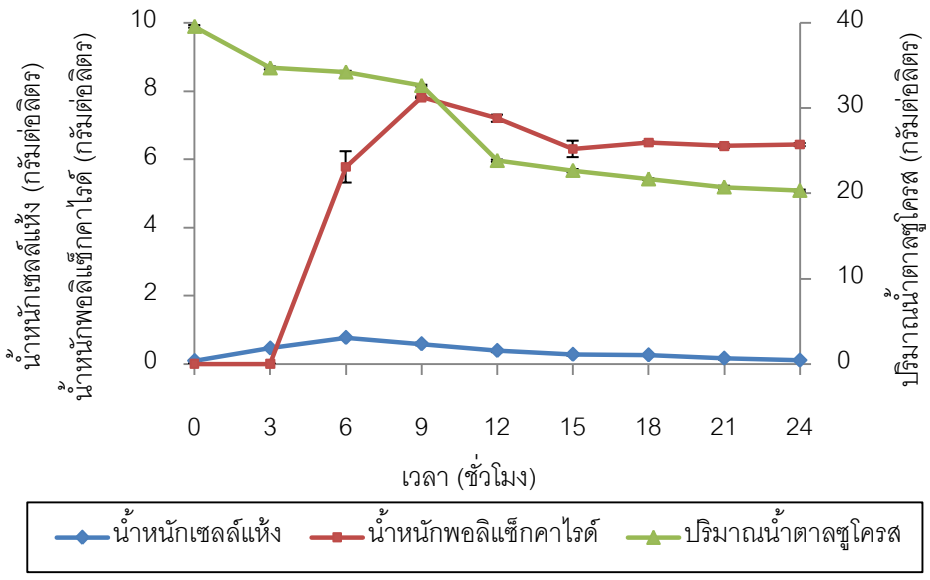
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.078±0.03	0.000±0.00	39.033±0.22
3	0.421±0.02	0.000±0.00	37.850±0.22
6	0.603±0.05	6.187±0.04	36.966±0.12
9	0.737±0.13	7.938±0.01	34.366±0.17
12	1.118±0.04	8.755±0.01	29.683±0.16
15	1.393±0.03	10.301±0.02	29.066±0.50
18	1.263±0.04	8.626±0.00	25.483±0.30
21	1.322±0.05	8.097±0.03	24.366±0.17
24	1.210±0.01	6.501±0.15	20.916±0.30



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 2 vvm

ตารางที่ 16 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 3 vvm

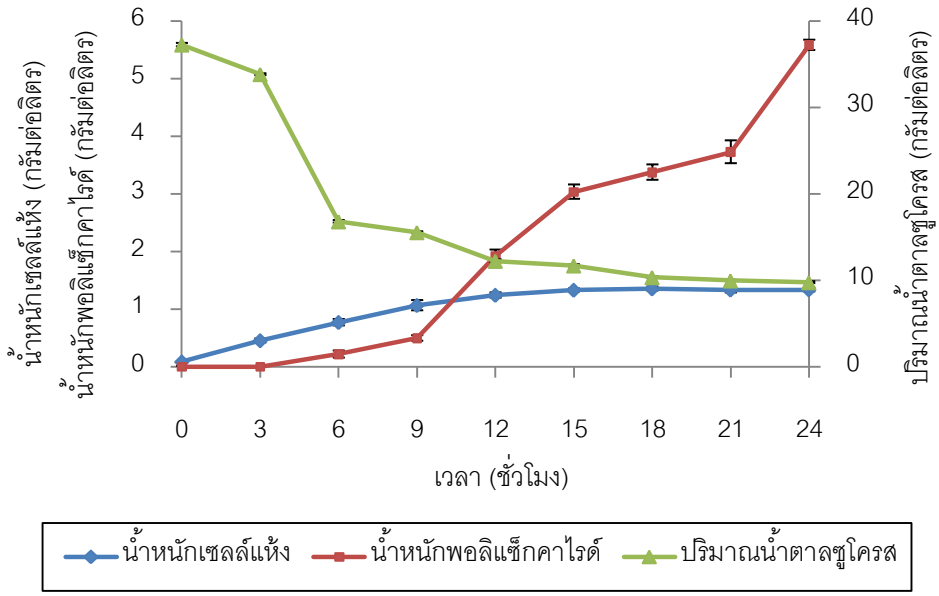
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.078±0.03	0.000±0.00	39.033±0.22
3	0.421±0.02	0.000±0.00	37.850±0.22
6	0.603±0.05	6.187±0.04	36.966±0.12
9	0.737±0.13	7.938±0.01	34.366±0.17
12	1.118±0.04	8.755±0.01	29.683±0.16
15	1.393±0.03	10.301±0.02	29.066±0.50
18	1.263±0.04	8.626±0.00	25.483±0.30
21	1.322±0.05	8.097±0.03	24.366±0.17
24	1.210±0.01	6.501±0.15	20.916±0.30



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 3 vvm

ตารางที่ 17 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 rpm

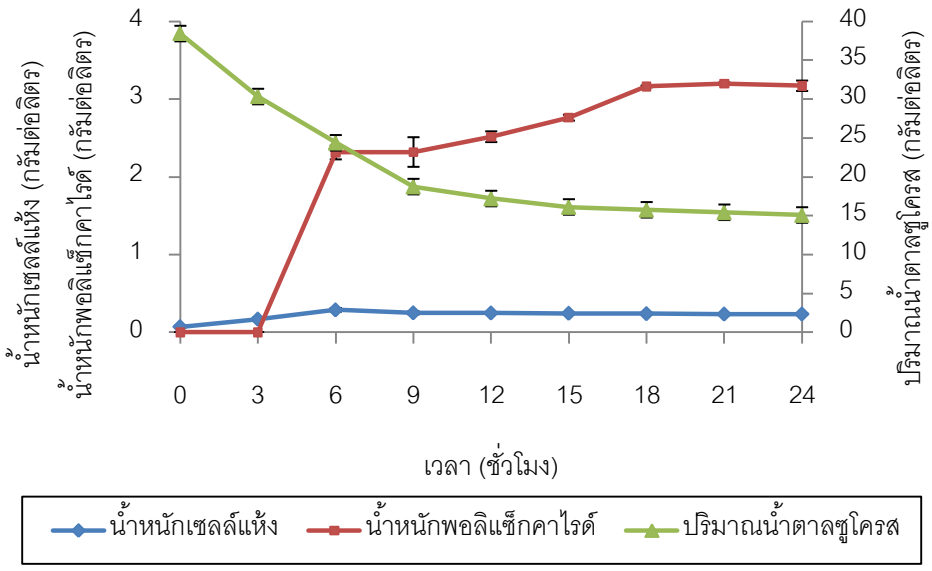
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.084±0.01	0.000±0.00	37.250±0.20
3	0.453±0.03	0.000±0.00	33.833±0.10
6	0.770±0.05	0.217±0.06	16.800±0.15
9	1.065±0.08	0.496±0.04	15.550±0.10
12	1.242±0.04	1.923±0.10	12.233±0.17
15	1.330±0.02	3.036±0.12	11.700±0.13
18	1.354±0.03	3.375±0.13	10.350±0.10
21	1.334±0.04	3.728±0.19	9.966±0.07
24	1.338±0.03	5.584±0.08	9.766±0.10



ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราความเร็วในการกวนของ ใบพัดที่ 200 rpm

ตารางที่ 18 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 400 rpm

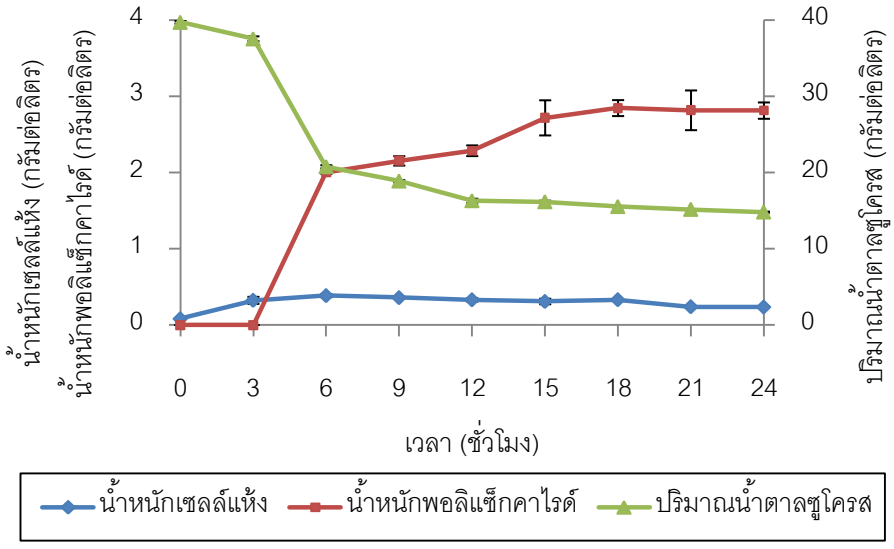
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.074±0.01	0.000±0.00	38.433±0.10
3	0.171±0.01	0.000±0.00	30.333±0.12
6	0.290±0.02	2.314±0.08	24.383±0.28
9	0.252±0.02	2.320±0.19	18.750±0.13
12	0.250±0.00	2.517±0.06	17.216±0.10
15	0.246±0.01	2.761±0.03	16.133±0.07
18	0.241±0.01	3.163±0.01	15.766±0.02
21	0.236±0.01	3.198±0.01	15.450±0.10
24	0.237±0.01	3.172±0.06	15.100±0.10



ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราความเร็วในการกวนของ ใบพัดที่ 400 rpm

ตารางที่ 19 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 600 rpm

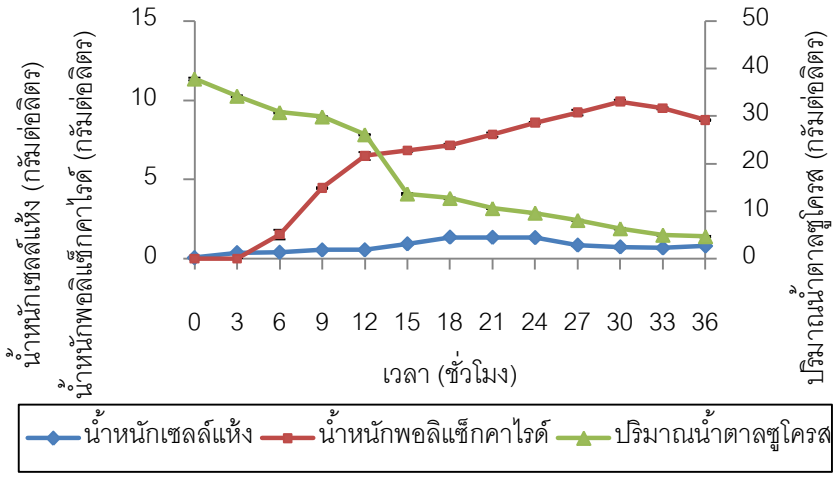
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.083±	0.000±0.00	39.716±0.17
3	0.326±	0.000±0.00	37.550±0.31
6	0.388±	2.003±0.02	20.766±0.20
9	0.361±	2.154±0.06	18.883±0.12
12	0.333±	2.287±0.07	16.300±0.27
15	0.311±	2.718±0.23	16.166±0.16
18	0.334±	2.846±0.10	15.533±0.07
21	0.242±	2.817±0.26	15.166±0.05
24	0.238±	2.813±0.10	14.816±0.07



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 600 rpm

ตารางที่ 20 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวน 200 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)
0	0.063±0.00	0.000±0.00	37.833±0.28
3	0.378±0.00	0.000±0.00	34.216±0.17
6	0.402±0.01	1.534±0.30	30.783±0.17
9	0.547±0.02	4.470±0.04	29.866±0.10
12	0.554±0.05	6.492±0.24	26.116±0.12
15	0.930±0.05	6.824±0.05	13.666±0.20
18	1.350±0.05	7.153±0.10	12.733±0.16
21	0.337±0.02	7.836±0.13	10.600±0.10
24	0.321±0.00	8.853±0.05	9.633±0.07
27	0.851±0.04	9.231±0.17	8.100±0.13
30	0.737±0.06	9.917±0.12	6.366±0.15
33	0.671±0.05	9.502±0.06	5.000±0.10
36	0.798±0.03	8.757±0.04	4.700±0.13



ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* UV1-9 ในระดับถังหมัก โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัด 200 rpm

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุกัญญา เกิดสุข เกิดวันศุกร์ ที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2528 ที่จังหวัดพะเยา ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา จากภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ การแพทย์ มหาวิทยาลัย นเรศวร ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 47 หมู่ 7 บ้านพระนั่งดิน ต. เวียง อ. เชียงคำ จ. พะเยา 56110

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับ นานาชาติ “TSB 2010 : The 22th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living” ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตตรัง ในหัวข้อเรื่อง “Exopolysaccharide-producing *Enterobacter cloacae* mutants strain UV1-9 and the chemical physical characterizations of its product”