

ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

นางสาวธิดารัตน์ วงศ์รัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM BACTERIA

Miss Thidarat Wongrat

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของ
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย
โดย	นางสาวธิดารัตน์ วงศ์รัตน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หรรหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทร์ทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

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

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชันญ์ ผลประไพ)

ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์ : ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก
แบคทีเรีย (CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF EXOPOLY
SACCHARIDES FROM BACTERIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุเทพ
ธนิยวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 114 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์
จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกจากธรรมชาติ ได้แก่ CU-CH1, CU-CH4, CU-E3, CU-F6,
CU-M2, CU-M4 และ CU-M5 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตมีทั้งที่เป็นชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์
และโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ และทั้งหมดมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก
แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1, CU-CH4 สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้องและมีความหนืดสูง
ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง
เป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันถั่วเหลืองสูงสุด และมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่
2.380 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และสมบัติทางกายภาพของพอลิ
แซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้งหมด 7 สายพันธุ์ จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4
มาทำการศึกษาต่อ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน
พบว่ามีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตมีประจุลบ
มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 87.5% และ 2.8% ตามลำดับ เมื่อทำ
บริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และเจลฟิลเทรชันพบ
พอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 เป็นลำดับส่วนหลัก มีมวลโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน การวิเคราะห์
หมู่ฟังก์ชันัลด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปียืนยันว่า EPS-2 เป็นพอลิ
แซ็กคาไรด์ และจาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม พบว่ามีสัญญาณของ anomeric proton non-anomeric
proton และการเชื่อมต่อกันแบบ β -D-configuration ของน้ำตาล พอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มี
น้ำตาลกลูโคส กาแลคโทส เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบย่อย
นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์นี้มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับ
น้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา..2552.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5172315023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES / CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS

THIDARAT WONGRAT : CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. SUTHEP THANIVAVARN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D., 114 pp.

In the present study, production, characterization of exopolysaccharide (EPS) from bacteria strain CU-CH1, CU-CH4, CU-E3, CU-F6, CU-M2, CU-M4 and CU-M5 were investigated. The polysaccharides from these strains were of either heteropolysaccharide or homopolysaccharide in nature, very stable at high temperature. Among these, polysaccharides from CU-CH4 and CU-CH1 are water soluble and displayed high viscosity with only CU-CH4 that displayed high water holding capacity. Owing to its highest EPS production, emulsifying activity of polysaccharide from strain CU-CH4 prompt its selection for further studies. Taxonomic studies via its morphological, biochemical and 16S rDNA, strain CU-CH4 was classified as member belong to the genus *Klebsiella*. Crude polysaccharide obtained was characterized as acidic in nature, composed of 87.5% total sugar and 2.8% protein. Upon purification by anion exchange and gel filtration chromatography, a main fraction designated as EPS-2 with molecular mass greater than 2×10^6 Da as analyzed via GPC and as polysaccharide upon analyzed by FT-IR spectroscopy. Chemical analysis showed its content of glucose and galactose as its major components with minor amount of rhamnose, its respective $^1\text{H-NMR}$ spectrum revealed both anomeric and non-anomeric proton signals and its hexose units are linked in a β -D-configuration. Its crude EPS also demonstrate flocculating activity as well as emulsifying activity in both oil and hydrocarbon.

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

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

Academic Year : ..2009.....Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีรยวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาติดา จันทร์ประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทร์ทองเงิน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัญ ผลประไพ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวงษ์ ภาควิชาเคมี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดุจฤทัย พงษ์เก๋า คະชิมา ภาควิชาวัสดุศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา เพื่อสนับสนุนทุนการศึกษาในระดับปริญญาโทบัณฑิต

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณน้องๆ ที่ห้อง 407 และ 448 พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย และทำให้มีช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์.....	4
2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์.....	9
2.3 ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์.....	13
2.4 เทคนิคการทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์.....	20
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	28
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	28
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.3.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยก จากธรรมชาติ.....	32
3.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์....	33

3.3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม การหารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์.....	35
3.3.5 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน.....	36
3.3.6 การทำบริสุทธิ์และการหาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก.....	43
4. ผลการทดลอง.....	47
4.1 ประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกจากธรรมชาติ	47
4.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์.....	48
4.2.1 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์.....	48
4.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์โดยการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมตริก.....	49
4.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการกักน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์.....	56
4.2.4 ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์.....	57
4.2.5 ทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์.....	58
4.2.6 วิเคราะห์ความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์.....	60
4.3 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมและศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์.....	61
4.3.1 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม.....	61
4.3.2 รูปแบบการเจริญ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4.....	63
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน....	64
4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	64
4.4.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี.....	65
4.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA.....	67
4.5 การทำบริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก.....	70

บทที่	หน้า
4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์.....	70
4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์.....	70
4.5.3 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์.....	70
4.5.4 ทำปฏิกิริยาพอลิแซ็กคาไรด์โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี.....	71
4.5.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี.....	73
4.5.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	75
4.5.7 ศึกษาโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์โดย ¹ H-NMR สเปกโทรสโกปี....	76
4.5.8 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี.....	77
4.5.9 การศึกษาความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ CU-CH4.....	81
4.5.10 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ... ..	82
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	84
รายการอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก.....	104
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	105
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	107
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	111
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	113
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	114

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	11
2.2 สมบัติต่างๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	14
4.1 ประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	47
4.2 แสดงชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 จากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนโตรล (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที.....	48
4.3 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5.....	56
4.4 ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.1% ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5.....	57
4.5 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช ในอัตราส่วน 1:1.....	58
4.6 ค่าความหนืดของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	60
4.7 ลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5.....	62
4.8 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4.....	66
4.9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn).....	68

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของเดกซ์แทรน..... 5
2.2	โครงสร้างของพุลลูแลน..... 6
2.3	โครงสร้างของแซนแทน..... 7
2.4	โครงสร้างของเจลแลน..... 7
2.5	เทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี..... 21
2.6	เทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (HPLC)..... 23
2.7	เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)..... 24
2.8	ส่วนประกอบของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี..... 26
4.1	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน..... 49
4.2	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน..... 50
4.3	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-E3 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน..... 51
4.4	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-F6 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน..... 52

รูปที่	หน้า	
4.5	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M2 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	53
4.6	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M4 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	54
4.7	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสีย น้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 โดยใช้ภาวะใน การทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	55
4.8	ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 และแซนแทน ตลอดระยะเวลา 14 วัน	59
4.9	รูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ใน อาหารเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหวิโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความ เข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	63
4.10	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	64
4.11	ลักษณะแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	65
4.12	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 บนอาหารแข็ง MacConkey.....	65
4.13	phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 โดยใช้ 16S rDNA ของ <i>Plesiomonas shigelloides</i> สายพันธุ์ NCIMB9242 เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	69

รูปที่	หน้า	
4.14	ลักษณะตะกอนสีขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ภายหลังจากการเติมสารละลาย เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ใน สารละลาย พอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์แมล.....	71
4.15	โครมาโทแกรมการทำบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย <i>Klebsiella</i> sp. สาย พันธุ์ CU-CH4 โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบบน DEAE-cellulose คอลัมน์ สะสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำกลั่นและเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นจาก 0 ถึง 2 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	72
4.16	โครมาโทแกรมการทำบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ P-2 โดยเจลฟิลเทรชันโครมาโท กราฟีบน Superdex G-200 คอลัมน์ สะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที.....	73
4.17	โครมาโทแกรมของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	74
4.18	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเดกซ์แทรน T2000 มวลโมเลกุล 2×10^6 ดาลตัน จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	74
4.19	สเปกตรัมของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทร สโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy).....	75
4.20	สเปกตรัมของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (FT-NMR) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส	76
4.21	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (แรมโนส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิ โทไนไตรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อ นาที.....	78
4.22	โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังจากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไตรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	79

รูปที่	หน้า	
4.23	โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโตนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	79
4.24	โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโตนไทรล์ความเข้มข้นเริ่มต้น 90% โดยปริมาตรจนถึง 80%โดยปริมาตรในช่วงเวลา 30 นาทีเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	81
4.25	ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ความเข้มข้น 5 - 40 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	82
4.26	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ CU-CH4 กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ.....	83

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
:	=	อัตราส่วนต่อ
x	=	เท่าทวีคูณ
cps	=	เซนติพอยส์
cm^{-1}	=	ต่อเซนติเมตร
OD_{550}, A_{550}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร
δ	=	chemical shift
ppm	=	ส่วนต่อล้านส่วน

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุล บางครั้งประกอบด้วยน้ำตาลเชิงเดี่ยวมากกว่าหนึ่งชนิดเชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิกเป็นสายยาว และอาจมีการแตกแขนงหรือไม่แตกก็ได้และโดยมากจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Yang และ Zhang, 2009) สามารถละลายน้ำได้ และมีสมบัติไฮโดรคอลลอยด์สามารถกูดน้ำได้ดี เมื่อละลายในของเหลวจะทำให้ของเหลวมีความหนืดมากขึ้น (Ying และคณะ, 2006)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติจัดเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพ ซึ่งมีสมบัติทางกายภาพเฉพาะตัวและมีสมบัติการไหล (rheological properties) ที่ดี ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และเป็นสารที่สลายได้ง่าย สามารถประยุกต์ใช้ได้ ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง (Ying และคณะ, 2006) ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษและสี เป็นต้น (Vinarta และคณะ, 2007) ด้วยสมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสม จึงได้รับการใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น ด้วยความสามารถในการกูดน้ำจึงมีการประยุกต์ใช้ในการก่อสร้างคอนกรีตเพื่อป้องกันการแตกของชั้นคอนกรีต (Anonymous, 1996) อุนหนุมิหลอมเหลวที่เหมาะสม ที่ให้ความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์ (Zohuriaan และ Shokrolahi, 2004) การละลายน้ำ เช่น แชนแทนเมื่อละลายน้ำจะมีความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำจึงมีลักษณะเป็นซูโดพลาสติก (pseudo plastic) ที่มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสี สารเคลือบผิว (Rinaudo และ Milas, 1978) พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติด้านความหนืดและการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับไปใช้ในอุตสาหกรรม อาหาร ยา และเครื่องสำอางค์ (Kodali และคณะ, 2009) เป็นต้น ในด้านการบำบัดน้ำเสีย มีรายงานการใช้พอลิแซ็กคาไรด์เป็นตัวจับในการดึงเอาโลหะหนักออกจากน้ำเสีย (Ozdemir และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ทางด้านการแพทย์ เช่น ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด และมีสมบัติด้านมะเร็งได้ (Fan และคณะ, 2007)

ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีทั้งชนิดที่ได้จากธรรมชาติ และที่สังเคราะห์ขึ้น โดยมีจำหน่ายทางการค้ามีทั้งที่ผลิตได้จาก พืช สัตว์ สาหร่ายและจุลินทรีย์ (Yang และ Zhang, 2009) ทั้งนี้จุลินทรีย์จัดเป็นแหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญ การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มีประโยชน์ค่อนข้างมาก เนื่องจากความหลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ในงานและอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ นอกจากนี้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ในปริมาณสูงในเวลาเพียงสั้นๆ ขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยากและยังสามารถผลิตได้ในภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูกาล หรือมลพิษทางทะเล (Yun และ Park, 2003) ในขณะที่ปัจจัยเหล่านี้มีผลกระทบต่อการผลิตจากพืชหรือสาหร่าย ทำให้จุลินทรีย์มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าพืชหรือสาหร่าย (Freitas และคณะ, 2009)

ปัจจุบันการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ทวีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีสมบัติเฉพาะตัวที่ดี จึงมีการศึกษาเพื่อคัดแยกเชื้อที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สำหรับการหาพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์โดยอาศัยการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และตรวจสอบสมบัติต่างๆ เช่น ความข้นหนืด การเกิดเจล น้ำหนักโมเลกุล อุณหภูมิการย่อยสลาย (Kumar และคณะ, 2004) เพื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ได้ ในอุตสาหกรรมต่างๆ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกจากธรรมชาติ และคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงและมีลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีที่ดี

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1. ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้
2. ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์
3. คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม ศึกษารูปแบบการเจริญ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน
5. ทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้ทำให้ทราบสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่คัดแยกจากธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลเพื่อนำไปใช้พัฒนาอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ

บทที่ 2

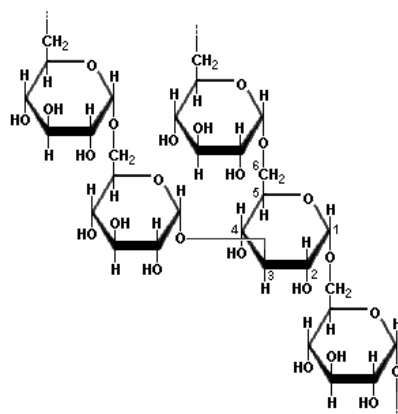
ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุล และอาจมากกว่าหนึ่งชนิดเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกเป็นสายยาว และอาจมีการแตกแขนงหรือไม่ก็ได้ เป็นสารประกอบที่ไม่มีรสหวาน โดยมากจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Yang และ Zhang, 2009) และมีสมบัติไฮโดรคอลลอยด์สามารถดูน้ำได้ดี พอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดสามารถละลายน้ำได้ เมื่อละลายในของเหลวจะทำให้ของเหลวมีความหนืดมากขึ้น (Ying และคณะ, 2006) พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โครงแบบ และตำแหน่งของพันธะไกลโคซิดิกและลักษณะของสายพอลิเมอร์ที่เป็นสายตรง (linear) หรือที่แตกแขนง (branch) โครงสร้างที่แตกต่างกันนี้ จะมีผลทำให้พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดทำงานทางชีวภาพที่แตกต่างกัน (Lehninger, 1993) พอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีหน้าที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (structural polysaccharide) ของเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ เสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่เซลล์ ตัวอย่างเช่น เพกทิน (pectin) เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช ไคตินที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกของสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ปู แมลง และผนังเซลล์ของพวกรา ยีสต์และจุลินทรีย์อีกหลายชนิด พอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารไว้ในเซลล์ เมื่อมีความต้องการหรือยามขาดแคลนจะนำไปใช้โดยถูกย่อยด้วยเอนไซม์ กลายเป็นน้ำตาลหน่วยย่อย เช่น แป้ง ซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารของพืช และไกลโคเจน (glycogen) ที่เป็นแหล่งสะสมอาหารของสัตว์ (Lehninger, 1975; BeMiller and Whistler, 1996) พอลิแซ็กคาไรด์มีองค์ประกอบแตกต่างกันไปตามชนิดของโมโนแซ็กคาไรด์ที่มาเชื่อมต่อกัน เช่น กลูโคส กาแลคโทส แรมโนส แมนโนส เอ็นอะซีติลกลูโคซามีน เอ็นอะซีติลกาแลคโตซามีน และ กรดกลูควิโรนิก เป็นต้น ทำให้สามารถแบ่งพอลิแซ็กคาไรด์ตามชนิดของโมโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบได้เป็น 2 กลุ่มดังต่อไปนี้ (Margaritis และ Pace, 1985; Duboc และ Mollet, 2001)

1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย โมโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียว เช่น พูลลูแลน (Pullulan) เดกซ์แทรน (Dextran) ซึ่งมีกลูโคสเป็น องค์ประกอบ โดยการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้สันนิษฐานว่าถูกสร้างมาจากการทำงานและการควบคุมของเอนไซม์ที่มีระบบไม่ซับซ้อน

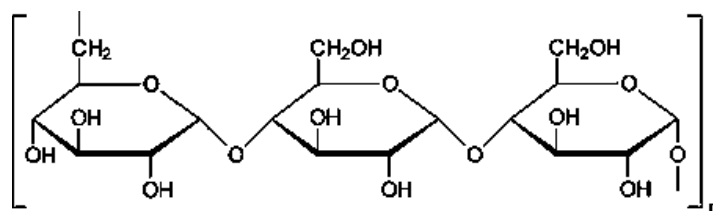
เดกซ์แทรน เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมา เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกหรือที่เรียกว่า กลูแคน (glucan) โดยพันธะไกลโคซิดิกจะเป็นชนิด α -1,6 เป็นส่วนใหญ่ และยังประกอบด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α -1,2 α -1,3 และ α -1,4 เป็น ส่วนของกิ่งสาขาอีกด้วย (Jeanes และคณะ, 1954; Robyt, 1986; Park และคณะ, 2001) ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งสามารถผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Leuconostoc* sp. *Streptococcus* sp. และ *Acetobacter* sp. (Qader และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเดกซ์แทรน

ที่มา: Zamora (2005)

พูลลูแลน เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงประกอบด้วยหน่วยของมอลโทไตรโอส (maltotriose) เชื่อมด้วย α -1,4- และ α -1,6- กลูแคน โดยหน่วยกลูโคสในมอลโทไตรโอสจะเชื่อมกันด้วยพันธะ α -1,4 ไกลโคซิดิก ในขณะที่มอลโทไตรโอสจะเชื่อมกับตัวอื่นด้วยพันธะ α -1,6 ไกลโคซิดิก ซึ่งผลิตโดย *Aureobasidium pullulans* (Seo และคณะ, 2004) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.2

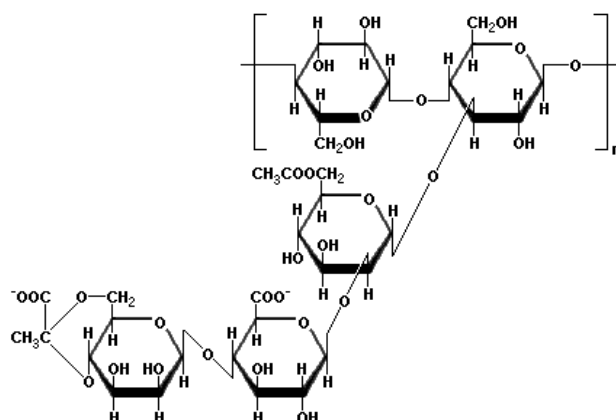


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของพอลลูแลน

ที่มา: Fao (2005)

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของโมโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 ชนิด ขึ้นไป เช่น แชนแทน ประกอบด้วย กลูโคส แมนโนส และกรดกลูควโรนิกเป็นองค์ประกอบ เจลแลน ประกอบด้วยกลูโคส แรมโนส และกรดกลูควโรนิกเป็นองค์ประกอบ (Laws และคณะ, 2001) เป็นต้น สร้างขึ้นมาจากการทำงานและการควบคุมของเอนไซม์ที่มีระบบซับซ้อน

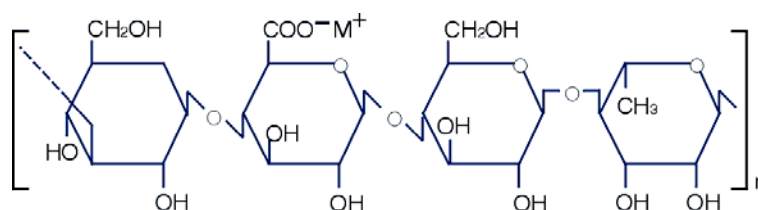
แชนแทน เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งผลิตโดย *Xanthomonas campestris* ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยเพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharide) ประกอบไปด้วย กลูโคส แมนโนส กรดกลูควโรนิก ในอัตราส่วนทั้งหมด 2:2:1 โดยมี acetal เชื่อมกรดไพรูวิกและหมู่อะซิทิล (Baird, 1989) ซึ่งแกนกลางของสายพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยสองหน่วยของบีตา-ดี-กลูโคส (β -D-glucose) เชื่อมตรงตำแหน่ง 1 และ 4 สายด้านข้างประกอบด้วยแมนโนส 2 ตัว และกลูควโรนิก 1 ตัว ดังนั้นทั้งสายจึงประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล 5 หน่วยซ้ำ สายข้างเชื่อมกับกลูโคสอื่นตำแหน่งที่ 3 ของแกนกลาง หน่วยของแมนโนสตัวสุดท้ายมีหมู่กรดไพรูวิกเชื่อมด้วยหมู่ ketal ที่ตำแหน่ง 4 และ 6 และหน่วยแมนโนสอื่นมีหมู่อะซิทิล ตำแหน่งที่ 6 โดยสายเหล่านี้จะอยู่ในรูปเฮลิคซ์คู่ (double helix) ทำให้มีประสิทธิภาพสูงทางด้านความหนืด (Sutherland, 1990; Mandala และคณะ, 2004) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแซนแทน

ที่มา: Zamora (2005)

เจลแลน เป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีลักษณะเป็นเส้นตรงของหน่วยเตตระแซ็กคาไรด์ ผลิตโดย *Sphingomonas paucimobilis* (ชื่อเดิม *Pseudomonas elodea*) (Kang และ Veeder, 1982; Martin และคณะ, 1996) ประกอบด้วย ดี-กลูโคส, ดี-กลูควิโรนิก แอซิด (GlcA) และที่เหลือเป็นแอล-แรมโนส (Rha) (Jansson และคณะ, 1983) ซึ่ง (1-3)-ปีตา-ดี-กลูโคส, (1-4)-ปีตา-ดี-กรดกลูควิโรนิก, (1-4)-ปีตา-ดี-กลูโคส และ (1-4)-แอลฟา-แอล-แรมโนส เชื่อมต่อกันเป็นแกนกลาง (backbone) (Noda และคณะ, 2008) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเจลแลน

ที่มา : Paradise (2007)

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ ตามประจุบนโมเลกุลได้เป็น 3 ชนิด คือ (Margaritis และ Pace, 1985)

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (Anionic polysaccharides) หรือบางครั้งเรียกว่า Acidic polysaccharides เช่น แชนแทน ที่มีหมู่อะเซทิลกับไฮดรอกซิลบนโมเลกุล
2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (Neutral polysaccharides) ได้แก่ ลีแวน พูลูลูแลน เดกซ์แทรน และสเครอโรไกลูแคน
3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุบวก (Cationic polysaccharides) ได้แก่ พวกที่มีหมู่ NH_3^+ ฯลฯ หรือมีหมู่ของกรดอะมิโนบางตัวต่ออยู่

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามแหล่งที่มา ดังนี้ (Glicksman, 1979)

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากธรรมชาติ (natural polysaccharide) ซึ่งผลิตโดย พืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ ได้แก่
 - 1.1 พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล (Seaweed extracts) ตัวอย่างได้แก่ คาราจีแนน อะการ์ เฟอเซลล์ลาแรน และอัลจิเนต
 - 1.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากพืช เช่น เพคติน อะราบิโนกาแลคแทน
 - 1.3 พอลิแซ็กคาไรด์จากเมล็ดของพืช (Plant seed gums) ตัวอย่างเช่น โลคัส บีนกัม (Locust bean gum) กัวร์กัม (Guar gum) ควินซ์กัม (Quince gum) และทามารินด์กัม (Tamarind gum)
 - 1.4 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากยางพืช (Plant exudated gums) เช่น กัมอาราบิก (Gum Arabic) กัมคารายา (Gum karaya) และ กัมทรากาแคนท์ (Gum tragacanth)
 - 1.5 พอลิแซ็กคาไรด์จากสัตว์ (Animal-derived) เช่น ไคติน
 - 1.6 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ (Microbial polysaccharide) ตัวอย่างเช่น แชนแทน (Xanthan) เดกซ์แทรน (Dextran) เคอร์ดีแลน (Curdland)
2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ดัดแปลงจากสารที่ได้จากธรรมชาติ (modified natural polysaccharide) ได้แก่ อนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เมทิลเซลลูโลส ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส

3. พอลิแซ็กคาไรด์สังเคราะห์ เช่น การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์โดยการใช้น้ำมันไกลโคไซด์ และน้ำมันไกลโคซินเทส (Faijes และ Planas, 2007)

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (Microbial polysaccharides)

ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีทั้งที่ได้จากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ โดยที่จำหน่ายในท้องตลาด มีทั้งที่ผลิตได้จาก พืช สัตว์ สาหร่ายและจุลินทรีย์ (Yang และ Zhang, 2009) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มีความสำคัญมากขึ้นเนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีโครงสร้าง และสมบัติที่หลากหลาย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งของพอลิเมอร์ที่สำคัญของอุตสาหกรรมและนำไปสู่การแข่งขันทางการค้ากับพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติที่ผลิตจากสาหร่ายและพืช โดยข้อดีของจุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น มีขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยาก และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย (Yun และ Park, 2003) โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูกาล หรือมลพิษทางทะเล ในขณะที่เราต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้เมื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าพืชหรือสาหร่าย (Freitas และคณะ, 2009)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีการสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 แบบ คือ (Paul, 1979)

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular polysaccharides) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะสร้างอยู่ภายในเซลล์ บางส่วนจะรวมเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) และทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารจำพวกคาร์บอนหรือแหล่งสะสมพลังงานของเซลล์

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง (Structural polysaccharides) เป็นองค์ประกอบที่แทรกตัวอยู่ในผนังเซลล์และในบางกรณีอาจรวมตัวกับส่วนประกอบอื่น เช่น ลิพิด เป็นไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharides) และรวมกับพอลิเพปไทด์เป็นเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นต้น

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์ (Extracellular polysaccharides: EPS) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้สร้างขึ้นเพื่อเป็นโครงสร้างที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า แคปซูล (capsule) มีลักษณะเป็นสารเหนียวคล้ายเจลเคลือบหรือปกคลุมเซลล์ มักทำให้โคโลนีของ

แบคทีเรียเป็นเมือกเยิ้ม (mucoïd) หรือบางชนิดที่สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ละลายอยู่ในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์นั้นๆ มีลักษณะเป็นเมือก และทำให้อาหารเหลวมีลักษณะข้นหนืด ซึ่งนิยมผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพราะง่ายต่อการสกัด และแยกออกจากผนังเซลล์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราเช่น *Xanthomonas campestris* ผลิตแซนแทน (Kalogiannis และคณะ, 2003) *Pseudomonas elodea* ผลิตเจลาแลน (Matsukawa และ Watanabe, 2007) *Leuconostoc mesenteroides* ผลิตเดกซ์แทน (Santos และคณะ, 2005) *Alcaligenes faecalis* ผลิตเคอร์ดีแลน (Harada, 1977) *Aureobasidium pullulans* ผลิตพูลูลูแลน (Seo และคณะ, 2004) *Sclerotium rolfsii* ผลิตสเครอโรกูแคน (Survase และคณะ, 2007) เป็นต้น ส่วนใหญ่พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์โดยมากเป็นพวกที่ละลายน้ำได้และเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์โดยละลายอยู่ในอาหารเหลวเรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ หรือ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรม เพราะง่ายต่อการสกัด และแยกออกจากผนังเซลล์ สารพวกนี้แม้จะมีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และบางกรณีซับซ้อน แต่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ง่ายและรวดเร็วจากวัตถุดิบที่หาได้ง่าย มีความหลากหลาย แสดงดังตารางที่ 2.4 ดังนั้นจึงนิยมผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 2.1 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	ซับสเตรต	ผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> สายพันธุ์ 10C3 LFO 13140	กลูโคส	เคอร์ดแลน (Curdlan)	Harada, 1977
<i>Azotobacter vinelandii</i> สายพันธุ์ NCIB 9068	ซูโครส	อัลจิเนต (Alginate)	Deavin และคณะ, 1977
<i>Arthrobacter viscosus</i> สายพันธุ์ NRRL B-1973	แลคโทส	พอลิเมอร์ของ กาแลคโทส กลูโคส และกรดกลูควิโรนิก	Stauffer และ Leeder, 1978
<i>Alcaligenes viscosus</i> สายพันธุ์ NRRL B-182	แลคโทส	ลีแวน (Levan)	Stauffer และ Leeder, 1978
<i>Aureobasidium pullulans</i> สายพันธุ์ S-1	ซูโครส	พูลลูแลน (Pullulan)	Ono และคณะ, 1977
<i>Erwina tahitica</i>	แลคโทส, Hydrolyzed starch	Erwina gum	Kang และคณะ, 1977
<i>Hansenula holstii</i> สายพันธุ์ NRRL y-2448	Hydrolyzed whey	ฟอสโฟแมนแนน (Phosphomannan)	Stauffer และ Leeder, 1978
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> สายพันธุ์ PCSIR-4 และ PCSIR-9	ซูโครส	เดกซ์แทรน	Qader และคณะ, 2005
<i>Methylocytis parvus</i> สายพันธุ์ OBBP	เมทานอล	พอลิเมอร์ของ กลูโคส แรมโนส แมนโนส และ กาแลคโทส	Hou และคณะ, 1978

ตารางที่ 2.1 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

จุลินทรีย์	ซับสเตรต	ผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas viscigena</i> สายพันธุ์ TS-1004	เมทานอล	พอลิเมอร์ของ กาแลคโทส กลูโคส แมนโนส และกรดกลู คิโรนิก	Misaki และคณะ, 1979
<i>Sclerotium gluconicum</i>	แป้ง	สเคลอโรกลูแคน (Scleroglucan)	Compere และ Griffith, 1978
<i>Serratia</i> sp.	ซูโครส และ กลูโคส	ดีแวน	Kojima และคณะ, 1993
<i>Xanthomonas fuscans</i>	กลูโคส	พอลิเมอร์ของ ดี-กลูโคส ดี-แมนโนส 6-ดีออกซี-แอล-แมน โนส และดี-ไรโบส	Konicek และคณะ, 1977
<i>Xanthomonas campestris</i> สายพันธุ์ NRRL B-1459	แลคโทส	แซนแทน	Stauffer และ Leeder, 1978
<i>Zymomonas mobilis</i> สาย พันธุ์ NCIB 8938	ซูโครส	ดีแวน	Dawes และคณะ, 1966; Ribbons และคณะ, 1962
<i>Zoogloa ramigera</i> สายพันธุ์ NRRL B-3669	แลคโทส	กาแลคโทกลูแคน (Galactoglucan)	Stauffer และ Leeder, 1978
<i>Zoogloea</i> sp.	กลูโคส	พอลิเมอร์ ประกอบด้วย กลูโคส ไซโลส แมนโนส ไรโบส กาแลคโทส อะราบิโนส และ กรดกลูคิโรนิก	Beedle และคณะ, 2000

2.3 ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษและสี เป็นต้น (Vinarta และคณะ, 2007) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติจัดเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพซึ่งมีสมบัติทางกายภาพเฉพาะตัวและมีสมบัติการไหล (rheological properties) ที่ดี ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และเป็นสารที่สลายได้ง่าย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง (Ying และคณะ, 2006) สมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ความสามารถในการกักน้ำ ซึ่งประยุกต์ใช้ในการก่อสร้างคอนกรีตเพื่อป้องกันการแตกแยกของชั้นคอนกรีต (Anonymous, 1996) อุณหภูมิหลอมเหลว ทำให้ทราบความเสถียร และการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมตริก (Thermogravimetric analysis; TGA) (Zohuriaan และ Shokrolahi, 2004) การละลายน้ำ เช่น แชนแทนเมื่อละลายน้ำจะมีความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ จึงมีลักษณะเป็นซูโดพลาสติก ใช้ในการประยุกต์ทางอุตสาหกรรมสี สารเคลือบผิว โดยหากเลือกตัวทำละลายที่ไม่ดี สารเคลือบผิวจะหลุดลอกได้ง่าย (Rinaudo และ Milas, 1978) พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติด้านความหนืดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารและเครื่องสำอางค์ (Renaud และคณะ, 2005) การเป็นอิมัลซิไฟเออร์เป็นสมบัติที่สำคัญสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Kodali และคณะ, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีสมบัติเฉพาะตัวอื่นๆอีกขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์นั้นๆ ทำให้สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้เสถียร สารจับเกาะ สารก่อเจล สารทำให้เลือดแข็งตัว สารหล่อลื่น สารขึ้นรูปฟิล์ม สารทำชั้น และสารที่ให้แวนิลอย (Margaritis และ Pace, 1985) ในด้านการบำบัดน้ำเสีย พบว่ามีการใช้พอลิแซ็กคาไรด์เป็นตัวจับในการดึงเอาโลหะหนักออกจากน้ำเสีย (Ozdemir และคณะ, 2003) นอกจากนี้ พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีประโยชน์ทางการแพทย์อีก เช่น ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด และมีสมบัติต้านมะเร็งได้ (Fan และคณะ, 2007)

2.3.1 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยมากจะใช้ชนิดที่สามารถละลายน้ำได้ และมีสมบัติเป็นสารจำพวกไฮโดรคอลลอยด์ สามารถคูดน้ำได้ดี เมื่อละลายในของเหลวจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของการไหล (rheological properties) ของน้ำที่มีอยู่ในอาหารเป็นผลให้

เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากความสามารถของการทำขึ้นเหน็ด จากสมบัติเหล่านี้พอลิแซ็กคาไรด์จึงได้ถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น โนแยม ซอส น้ำเชื่อม หรือไส้ขนม (Sanford และ Baird, 1983) โยเกิร์ต นมเปรี้ยว เนยแข็ง ขนมหวาน (Velasco และคณะ, 2006) และก๋อด้กษณะเจลในเจลลี่ พาย ขนมต่างๆ นอกจากนี้ยังใช้ในการเคลือบลูกกวาด การทำไอศกรีม และน้ำสลัด (Sutherland, 1990) เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติที่หลากหลาย แสดงดังตารางที่ 2.5 จึงนิยมนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้มากมาย

ตารางที่ 2.2 สมบัติต่างๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

หน้าที่	การประยุกต์ใช้ในอาหาร
สารจับยึด	น้ำตาลโรยหน้าขนม (ไอซิ่ง)
สารจับเกาะ	อาหารสัตว์
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
สารก่อการบวมตัว	ผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านกรรมวิธี
สารยับยั้งซินเนอเรซิส (syneresis)	เนยแข็ง และอาหารแช่แข็ง
สารเสริมการก่อเจล	เนื้อเจลสังเคราะห์ และอื่นๆ
สารทำขึ้น	แยม, ซอส, น้ำเชื่อม และไส้พาย

ที่มา: Sutherland (1990)

เจลแลน กัม (Gellan gum) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas elodea* มีสมบัติการไหลที่ดี ทำให้เกิดลักษณะข้นหนืดและมีเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์อาหาร (Yamamoto และ Cunha, 2007)

แซนแทน กัม เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตโดย *Xanthomonas campestris* นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เนื่องจากมีความสามารถเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ สามารถผสมเข้ากันได้ดีกับส่วนประกอบของอาหาร มีลักษณะข้นหนืด และมีสมบัติการไหลแบบซูโดพลาสติก (pseudoplastic rheological properties) (Garcia-Ochoa และคณะ, 2000)

พุลูลูแลน มีความสามารถในการให้ก๊าซออกซิเจนแพร่ผ่านได้ต่ำ เมื่อนำมาเชื่อมกันเป็นร่างแห (cross linked) กับวัสดุอื่นๆ สำหรับสร้างเป็นพอลิเมอร์ฟิล์มเพื่อใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มอาหาร ทำให้สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในอาหารได้ (Margaritis และ Pace, 1985)

Broadbent และคณะ (2001) รายงานว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตโดย *Streptococcus thermophilus* สามารถเป็นตัวช่วยเพิ่มความชื้นและสมบัติการละลายของ Mozzarella cheese ซึ่งนิยมใช้ในพิซซาให้ดีขึ้น เนื่องจากสมบัติด้านความหนืด การทำให้เกิดความเสถียร และสมบัติการจับเกาะกับโมเลกุลน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์

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

Kodali และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* สายพันธุ์ RK-02 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโทส แมนโนส ฟูโคส กลูโคส และกลูโคซามีน เป็นองค์ประกอบ และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีกับน้ำมันพืชต่างๆ และสารพวกที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic substrates) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา

2.3.2 ด้านการแพทย์

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารที่ได้รับความสนใจทางด้านการแพทย์โดยมีความเกี่ยวข้องของทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการแพทย์ เช่น ทางเภสัชกรรม โดยการใช้เป็นตัวห่อหุ้มยาหรือเป็นแคปซูล

สำหรับบรรจุยา และอาจใช้เพื่อตรึงเอนไซม์สำหรับการวินิจฉัยโรค หรือนำมาใช้สำหรับการปรับปรุงโดยวิธีการทางเคมี (chemical modification) ของผลิตภัณฑ์ยา สมบัติการไหล (rheology) และการก่อก้อนตะกอน และคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological properties) เช่น สมบัติต้านมะเร็ง สมบัติต้านไวรัส และอาจใช้เป็นวัคซีนแทนการใช้เซลล์จุลินทรีย์เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงเนื่องจากองค์ประกอบอื่นๆของเซลล์เช่น โปรตีน เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้ของพอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ (Sutherland, 1990)

เดกซ์แทรน มีบทบาทที่น่าสนใจทางการแพทย์โดยมีการนำไปใช้เป็นสารช่วยเพิ่มปริมาตรของโลหิต (blood-plasma volume expander) ในผู้ป่วย (Qader และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการนำอนุพันธ์ของเดกซ์แทรนมาใช้เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) (Sutherland, 1996) และมีการนำเดกซ์แทรนมาผสมลงในผลิตภัณฑ์ครีมทาผิว และยาขี้ผึ้งต่าง ๆ โดยเดกซ์แทรนจะทำหน้าที่รักษาความชื้นได้เป็นอย่างดี (De Belder, 2003)

เซลลูโลส เป็นพอลิเมอร์บีตา-1,4-ดี-กลูโคส ที่ไม่ละลายน้ำ สามารถผลิตจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* (Paul และคณะ, 1986) และในทางการแพทย์ได้มีการนำเซลลูโลสไปใช้ในการผลิตผิวหนังเทียม (artificial skin) และหลอดเลือดเทียม (artificial arteries) (Brown, 2002)

เคอร์ดีแลน เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสประกอบด้วย บีตา-1,3-กลูแคน และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ผลิตโดย *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ NCIM 2443 เคอร์ดีแลนประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถจับเกาะกับเอนไซม์ได้ดี จึงเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวยึดจับหรือเมทริกซ์ (matrix) ในการตรึงเอนไซม์ (Saudagar และ Singhal, 2004) สำหรับการวินิจฉัยโรค

Liu และคณะ (2009) พบว่า แบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ EJS-3 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีแมนโนส ฟรักโทส และกลูโคสเป็นองค์ประกอบ มีสมบัติต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งมีแนวโน้มที่ให้นำไปใช้ในการรักษาบำบัดโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคสมองเสื่อม หรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และความเสื่อมโทรมของเซลล์

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

2.3.3 ด้านการบำบัดน้ำเสีย

สารก่อการจับกลุ่ม (flocculants) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการของอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กระบวนการ downstream กระบวนการหมัก รวมถึงในการบำบัดน้ำเสีย (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) แม้ว่าสารก่อการจับกลุ่มที่สังเคราะห์ทางเคมีมีลักษณะเฉพาะตัวรวมทั้งมีประสิทธิภาพและราคาถูก แต่สารเหล่านี้ย่อยสลายยาก บางครั้งสารที่สังเคราะห์เป็นสารก่อการจับกลุ่มก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพและเพิ่มภาวะเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น polyacrylamide เป็นที่นิยมในการใช้เป็นสารก่อการจับกลุ่ม เกิดจากการรวมตัวของ acrylamide ซึ่งตรวจพบว่าเป็นพิษต่อประสาทและเป็นสารก่อมะเร็งต่อมมนุษย์ (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 bivalent และ trivalent cations คือการเพิ่มการเกาะติดของพอลิเมอร์ทางชีวภาพบนอนุภาคสารแขวนลอยโดยการลดประจุบนพอลิเมอร์และอนุภาคสารแขวนลอย (Levin และ Friesen, 1987; Levy และ คณะ, 1992)

Yun และ Park (2003) รายงานว่า จากการศึกษาศักยภาพทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. CP912 พบว่ามีความสามารถในการกักอิมัลชันระหว่างน้ำมันกับน้ำ และมีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มต่อแอกติเวตคาร์บอน (activated carbon) สูง

Prasertsan และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 สามารถผลิตเยื่อหุ้มโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ และมีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม ซึ่งมีกิจกรรมการก่อการจับกลุ่มสูงสุด (flocculating activity) ที่ความเข้มข้นของโพลีแซ็กคาไรด์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 40 มิลลิโมลาร์ CaCl_2 ซึ่งมีบทบาทร่วมกันต่อการตกตะกอนของดินขาว (kaolin)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการใช้โพลีแซ็กคาไรด์ดูดซับโลหะหนักโดยโพลีแซ็กคาไรด์สามารถใช้แยกโลหะหนักจากน้ำเสีย ซึ่งเกิดปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกของโลหะหนักและประจุลบของโพลีแซ็กคาไรด์ (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2003)

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

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

2.3.4 ด้านอุตสาหกรรมน้ำมัน

การขุดเจาะน้ำมันมีการพัฒนาการเจาะหลุมปิโตรเลียมจากแบบกระแทกมาเป็นแบบหมุน และอาศัยของไหลสำหรับการเจาะ (Drilling Fluid) หรือน้ำโคลนสำหรับการเจาะ (Drilling Mud) น้ำโคลนสำหรับการเจาะเป็นส่วนที่สำคัญมากอันหนึ่งของการทำงานในส่วนของการเจาะ มันเป็นตัวช่วยหล่อลื่นให้กับหัวเจาะและช่วยนำพาเศษดิน เศษหินที่ถูกเจาะหรือถูกตัด (Drill Cuttings) ขึ้นมาสู่พื้นผิว (Chilingarian และ Vorabutr, 1983) น้ำโคลนหรือของไหลสำหรับการเจาะ โดยปกติแล้วจะมีสมบัติเป็นของไหลแบบซูโดพลาสติกและต้องเสถียรภายใต้แรงเฉือน (shear forces) และอุณหภูมิระหว่างกระบวนการขุดเจาะน้ำมัน ในการขุดเจาะน้ำมันนั้นพบว่าได้มีการนำโพลีแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้เป็นของไหลหรือเป็นส่วนผสมในน้ำโคลนสำหรับการเจาะ (Sutherland, 1990)

เดกซ์แทรน เป็นโพลีเมอร์ที่นำมาใช้เป็นสารหล่อลื่นบริเวณหัวเจาะน้ำมัน เนื่องจากสมบัติของเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เก็บน้ำมันโดยใช้หลักในการแทนที่ ทำให้น้ำมันลอยตัวขึ้นมาส่วนบนจึงสามารถเก็บน้ำมันสะดวกขึ้น (Kim และคณะ, 2000)

แซนแทน มีสมบัติเป็นสารแขวนตะกอน (suspending agent) และสารให้ความหนืดที่ดี ซึ่งมีความเสถียรในช่วงของความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิที่กว้าง สามารถเข้ากันได้ดีกับเกลือและ สารเคมีต่างๆ ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการชุบเจาะน้ำมันได้ (Sutherland, 2001)

Paul และคณะ (1986) รายงานว่า PS-7 ก็เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Azotobacter indicus* เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส แรมโนส กรดกลูคิควิโดนิค และหมู่ O-acetyl สามารถละลายน้ำได้และทำให้สารละลายมีความหนืดสูง มีสมบัติเป็นของไหลแบบซูโดพลาสติกที่ดี มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง $4^{\circ}\text{C} - 93^{\circ}\text{C}$ มีความเสถียรและเข้ากันได้ดีกับ สารละลายเกลือที่ความเข้มข้นสูงได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นของไหล สำหรับการเจาะ

2.3.5 ด้านอุตสาหกรรมการย้อมและการพิมพ์สิ่งทอ

สมบัติด้านการทำขึ้น (thickener) และความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์หรือสารทำให้ เสถียรของพอลิแซ็กคาไรด์ มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมสีย้อมและการพิมพ์สิ่งทอ โดยช่วยเพิ่มการ แทรกซึมและการกระจายตัวของสีไปยังเส้นใย เป็นตัวช่วยเพิ่มความคงทนต่อการจับเกาะของสีกับ เส้นใยระหว่างกระบวนการอบแห้งหลังการพิมพ์ (Sutherland, 1990)

อัลจิเนต เป็นสารทำขึ้นที่ดีสำหรับนำมาใช้ในการพิมพ์สิ่งทอเนื่องจากสมบัติด้านความข้น หนืด ในการควบคุมสมบัติการไหลของสีเพื่อความคมชัด และความสะอาดของลวดลายบนเนื้อผ้า โดยป้องกันการกระจัดกระจายของสีบนเนื้อผ้า (Fijan และคณะ, 2007)

Paul และคณะ (1986) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ PS-10 ที่ผลิตโดยแบคทีเรียจากดิน ซึ่งมี น้ำตาลกลูโคส กาแลคโทส แมนโนส ฟูโคส และกรดกลูคิควิโดนิคเป็นองค์ประกอบ มีแนวโน้มที่จะ ประยุกต์ใช้ในการพิมพ์พรหม เนื่องจากมีความสามารถเข้ากันได้กับสีเบสิก(basic or cationic dye) และสามารถทนได้ดีต่อเอนไซม์เซลลูเลสและเสถียรต่ออุณหภูมิ

2.3.6 ด้านเกษตรกรรม

พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติเป็นสารก่อกอฟิล์ม จึงสามารถนำมาใช้เป็นสารเคลือบผิว เคลือบ เมล็ดและรากของพืช ป้องกันพืชจากความแห้งแล้งและสภาพแวดล้อมต่างๆได้ เพื่อรักษาอายุของ ผลผลิตทางการเกษตร ตัวอย่างเช่น การใช้อัลจิเนตเป็นสารเคลือบ (coating agent) ต้นอ่อนของ พืช (Sutherland, 1990)

2.4 เทคนิคการทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

2.4.1 โครมาโทกราฟี (Chromatography)

เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ประโยชน์สำหรับการแยกสาร ตรวจสอบ และ วิเคราะห์ชนิดของสาร การแยกตัวถูกละลายที่ผสมกันหลายชนิดในปริมาณน้อยให้ออกจากสารละลายผสม ซึ่งอาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ โดยสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน และถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ต่างกัน วิธีการนี้จะมีเฟส 2 เฟส ได้แก่ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) องค์ประกอบของสารผสมจะเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ โดยการไหลผ่านของเฟสเคลื่อนที่ การแยกของสารอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างสารตัวอย่าง (Skoog, 1988)

2.4.1.1 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange chromatography)

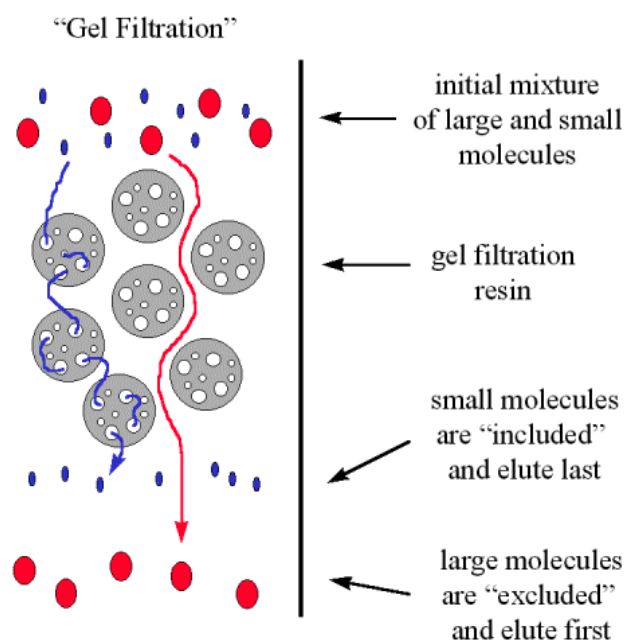
เทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลที่มีประจุ หรือโมเลกุลที่มีความสามารถในการแตกตัวให้ประจุออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของค่าประจุ (Net charge) และการดูดซับหรือจับกันแบบผันกลับได้ (Reversible adsorption) ด้วยแรงทางไฟฟ้า (Electrostatic force หรือ Ionic force) ที่แตกต่างกันของโมเลกุลที่มีประจุตรงข้ามกับไอออนของเฟสอยู่กับที่ และการจับกันนี้จะสามารถถูกไล่หรือแทนที่ได้ ด้วยโมเลกุลอื่นที่มีความสามารถในการจับกับเรซินได้ดีกว่า เข้ามาแข่งขันแย่งจับ เรซินสำหรับแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange resin) หรือตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger) สามารถเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchanger) และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion-exchanger) ซึ่งประกอบด้วยตัวค้ำจุน (matrix) เป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ ซึ่งมีหมู่ที่มีประจุติดกับตัวค้ำจุนด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bond) และมีประจุตรงกันข้าม (counter ions) จับกับหมู่ที่มีประจุบนตัวค้ำจุนด้วยพันธะไอออนิก (ionic bond) (Kraak, 1982) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน มี 2 แบบ (Fritz และ Gjerde, 2000) คือ

-โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) สารตัวกลาง (resin) มีประจุบวก เช่น ไดเอทิลอะมิโนเอทิล (Diethylaminoethyl :DEAE) ใช้ในการแลกเปลี่ยนโมเลกุลที่มีประจุลบ

-โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange chromatography) สารตัวกลาง (resin) มีประจุลบ เช่น คาร์บอกซีเมทิล (Carboxymethyl: CM) ใช้ในการแลกเปลี่ยนโมเลกุลที่มีประจุบวก

2.4.1.2 เจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี (Gel filtration chromatography)

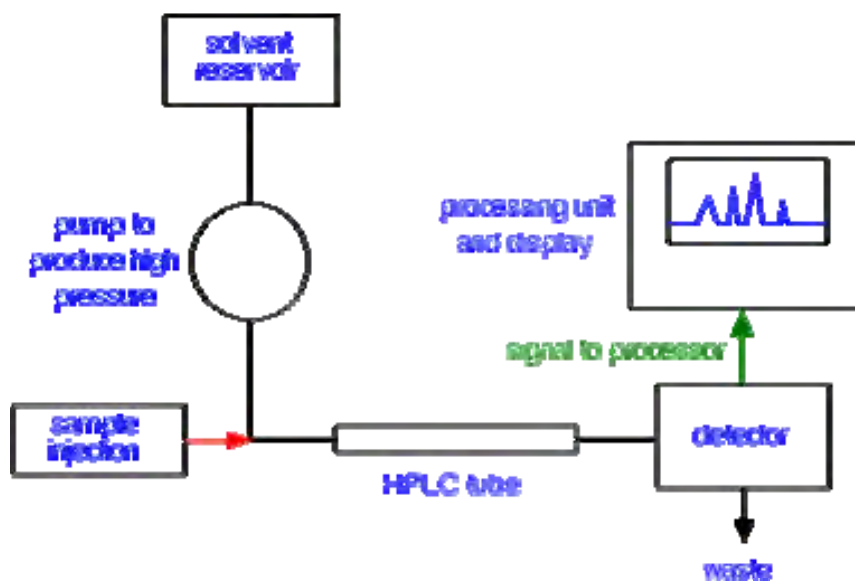
เทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) หรือ Size exclusion หรือ Gel permeation chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยสมบัติความแตกต่างกันของขนาด และมวลของโมเลกุล อาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างหรือรูพรุนภายในที่เกิดจากการเชื่อมโยงของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจลเมทริกซ์ (gel matrix) (Dawkins, 1982) ตัวเจลที่นิยมใช้กันทั่วไปได้แก่ เซฟาเดกซ์ (Sephadex) เซฟาโรส (Sephарose) และ ไบโอ-เจล เอ (Bio-Gel A) เป็นต้น โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้จึงถูกชะออกมากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อน ดังนั้นจึงสามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ แสดงดังรูปที่ 2.5 (Skog, 1988)



รูปที่ 2.5 เทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี
ที่มา: Hamley (2004)

2.4.1.3 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromatography)

เทคนิคแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ในการวิเคราะห์ทางด้านอาหารและยา ทางด้านการแพทย์ และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์สารปริมาณต่ำๆได้ในระดับไมโครกรัม (μg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบล้างดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับการดูดซับของสารประกอบนั้นกับเฟสอยู่กับที่ สารที่ดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าก็就会被แยกออกมาทีหลัง (Lindsay, 1991) และผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) แสดงดังรูปที่ 2.6 โดยระบบการแยกในเทคนิค HPLC มี 2 แบบตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่คือ การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสคงที่แบบเดียวตลอดการแยก (Isocratic) และการแยกโดยมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสคงที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบที่ไล่ชั้น (Gradient elution) (Skoog, 1988)



รูปที่ 2.6 เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

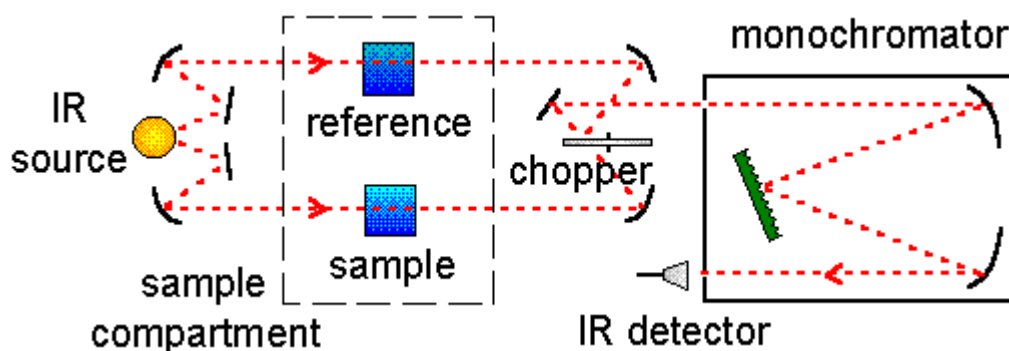
ที่มา: Clark (2007)

2.4.2 พูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR)

เป็นเทคนิควิเคราะห์โดยใช้รังสีอินฟราเรด รังสีอินฟราเรดเป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วง $0.7 - 500 \mu\text{m}$ หรือ wavenumber ในช่วง $1400 - 20 \text{ cm}^{-1}$ โดยช่วงของอินฟราเรดที่มีประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ช่วงความยาวคลื่นกลาง (Middle Infrared) ซึ่งมีประโยชน์ในการให้ข้อมูลด้านโครงสร้างโมเลกุล โดยรังสีอินฟราเรดจะมีพลังงานต่ำกว่ารังสี UV เมื่อโมเลกุลของสารดูดซับรังสีอินฟราเรด จะทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นและการหมุนของพันธะภายในโมเลกุลของสารตัวอย่าง โดยโมเลกุลจะดูดซับรังสีอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นเดียวกันกับความถี่ในการสั่นของโมเลกุลของสารนั้น ดังนั้นสารอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่าความถี่ในการสั่นจำเพาะที่แตกต่างกันไป ทำให้สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ประเภทของสารอินทรีย์ และหมู่พันธะเคมีในโมเลกุล (functional group) ของสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิกได้ โดยแสดงลักษณะของอินฟราเรดสเปกตรัมที่แตกต่างกันให้ผลในรูปแบบของรอยพิมพ์ลายนิ้วมือ (finger print) หรือ FTIR marker ซึ่งมีความจำเพาะในตัวอย่างแต่ละชนิด (Gooch, 1997) นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการ

วิเคราะห์ด้านคุณภาพ เช่นการวิเคราะห์ชนิดของหมู่ฟังก์ชันนัล (functional group) แล้วก็ยังสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อีกด้วย โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ตามกฎหมายของ Beer-Lambert's Law ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างในสารละลายจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการดูดซับ (Absorbance) ของสารละลายนั้น เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ของเหลวและก๊าซ โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างในการวัดตัวอย่างแบบต่าง ๆ เช่นการใช้ KBr disk สำหรับตัวอย่างของแข็งหรือการใช้ liquid cell สำหรับตัวอย่างของเหลว หรือ gas cell สำหรับตัวอย่างที่เป็นก๊าซ เป็นต้นอีกทั้งเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำสูงและเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่างอีกด้วย เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่นการวิเคราะห์ด้านพอลิเมอร์ บีโตรีเคมี สามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งงานด้านชีววิทยา ชีวเคมี การแพทย์ สิ่งแวดล้อม อาหาร และทางด้านเคมีอินทรีย์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์สารได้ (Smith, 1996)

ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FTIR) ประกอบไปด้วย แหล่งกำเนิดแสง (IR Source)จะถูกให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิสูงและจะปลดปล่อยแสงที่มีความถี่ในช่วงอินฟราเรดออกมา Monochromator สำหรับแยกลำแสงเป็นลำแสงความยาวคลื่นเดียวทำให้แสงแต่ละความยาวคลื่นถูกตรวจวัดในเวลาที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ และตัวตรวจวัด (Detector) ทำหน้าที่ตรวจวัดพลังงานแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)

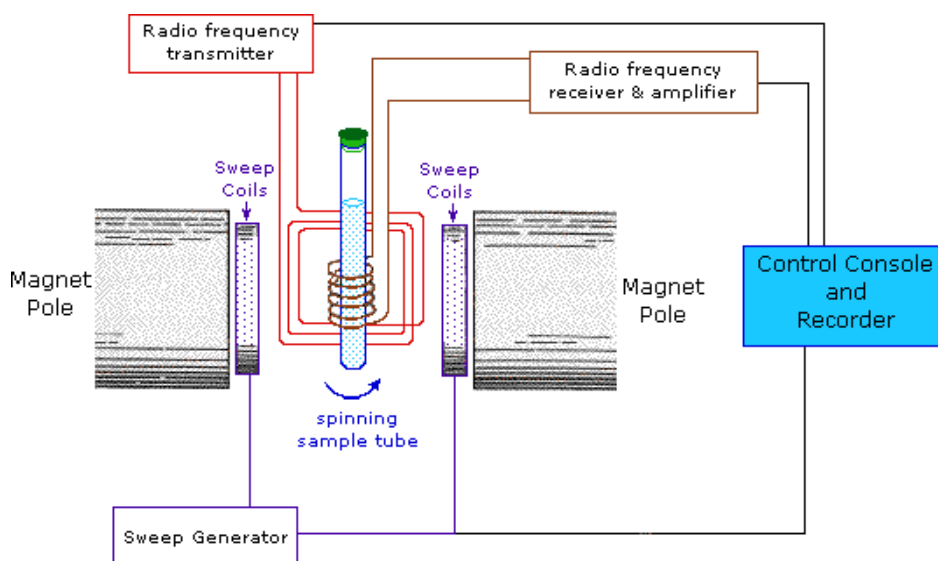
ที่มา: Hsu (1996)

2.4.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR Spectroscopy) เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ โดยการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นวิทยุ กับนิวเคลียสที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลขณะวางอยู่ในสนามแม่เหล็ก นิวเคลียสเหล่านี้มีสมบัติทางสนามแม่เหล็กต่างกัน ซึ่งนิวเคลียสที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับสนามแม่เหล็กได้ต้องมีเลขสปินควันตัม (spin quantum number, $I > 0$) มากกว่าศูนย์ (Field และ Sternhell, 1989) นิวเคลียสที่มีเลขสปินมากกว่า 0 จะมีคุณสมบัติเสมือนหนึ่งว่าหมุนรอบตัวเองได้เนื่องจากภายในนิวเคลียสเหล่านี้มีประจุอยู่ โดอนิวเคลียสของธาตุที่มีประจุ ประจุนี้จะหมุน (spin) เป็นวงรอบแกนนิวเคลียส ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะของนิวเคลียสแต่ละชนิดเมื่ออยู่ภายใต้สนามแม่เหล็ก การสปินของนิวเคลียสนี้จะก่อให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็ก (magnetic moment) เมื่อมีสนามแม่เหล็กภายนอกกระทำกับนิวเคลียส จะไปทำให้นิวเคลียสที่จำเพาะเจาะจงเกิดการหันไปในทิศทางที่แน่นอนเมื่อเทียบกับทิศทางของสนามแม่เหล็ก ทิศทางการจัดตัวที่ต่างกันจะมีค่าพลังงานที่ต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลค่าพลังงานที่วัดได้มาบ่งบอกถึงทิศทางการจัดตัวของนิวเคลียสชนิดต่าง ๆ ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างเข้าเครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์ จะได้ สเปกตรัมซึ่งเป็นผลของการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ความถี่ต่างๆ ผลของ NMR สเปกตรัมจะบอกได้นิวเคลียสที่ถูกดูดกลืนพลังงานนั้นมีสภาวะแวดล้อมทางเคมีอย่างไร หรืออีกนัยหนึ่งนิวเคลียสนั้นๆอยู่ที่ตำแหน่งใดในโมเลกุลรวมทั้งสามารถบอกจำนวนนิวเคลียสที่อยู่ในตำแหน่งนั้นๆได้ด้วย (Gooch, 1997)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) จะประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ แม่เหล็ก ตัวส่ง (radiofrequency generator) ตัวรับสัญญาณคลื่นวิทยุ (detector and amplifier) ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งสัญญาณคลื่นวิทยุไปยังตัวอย่างและตรวจวัดสัญญาณที่ถูกดูดกลืนหรือปลดปล่อยออกมา และเครื่องคอมพิวเตอร์หรือตัวแสดงผล แสดงดังรูปที่ 2.6 ซึ่งยุคแรกการวัดสัญญาณ NMR จะทำในลักษณะที่เรียกว่า continuous wave (CW) โดยเครื่องส่งสัญญาณคลื่นวิทยุจะต้องแปรความถี่ของคลื่นวิทยุ ซึ่งส่งผ่านเข้าไปในตัวอย่างเรื่อยๆ และตรวจวัดสัญญาณหลังจากผ่านตัวอย่างเปรียบเทียบกับสัญญาณที่ส่งเข้าไปที่ความถี่เดียวกัน หากความเข้มของสัญญาณลดลงก็แสดงว่ามีการดูดกลืนเกิดขึ้น ลักษณะการดูดกลืนก็จะเป็นพีคซึ่งจะนำมาพล็อตเทียบกับความถี่คล้ายกับในกรณีของอินฟราเรดสเปกตรัม ซึ่งเทคนิคนี้ต้องใช้เวลานาน และไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ ต่อมาจึงมีการ

พัฒนาเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Pulsed NMR ซึ่งจะเป็นการส่งสัญญาณคลื่นวิทยุที่ทุกความถี่ในช่วงที่สนใจเข้าไปยังตัวอย่างพร้อม ๆ กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการพลิกของสปินทั้งหมดอย่างทันทีทันใดเรียกว่าอยู่ในสถานะถูกกระตุ้น (excited state) จากนั้นนิวเคลียสก็จะกลับเข้าสู่สถานะเดิม (ground state) พร้อมทั้งปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของคลื่นวิทยุ เฉพาะความถี่ที่เกิดการดูดกลืนซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ค่าก็ได้ ความถี่ของคลื่นที่ปลดปล่อยออกมานี้จะอยู่ในรูปของคลื่นที่ซ้อนกันที่เรียกว่าสัญญาณ FID (free induction decay) ซึ่งสามารถแยกออกเป็นแต่ละความถี่โดยที่แต่ละความถี่ก็มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกันได้ โดยกระบวนการทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่าฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม (Fourier transform) ดังนั้นเครื่อง NMR สมัยใหม่จึงมักเรียกว่า FT-NMR การทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มจะต้องใช้การคำนวณที่ซับซ้อน คอมพิวเตอร์สำหรับเก็บข้อมูลและประมวลผลจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับ FT-NMR ข้อดีของ FT-NMR คือสามารถเก็บสัญญาณ FID รวมกันได้หลาย ๆ ครั้ง แล้วนำมาทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเพียงครั้งเดียวซึ่งจะทำให้ได้สัญญาณที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะกับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย (Friebolin, 2005)



รูปที่ 2.8 ส่วนประกอบของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR spectroscopy)

ที่มา: Reusch (2007)

2.4.4 เทอร์โมกราวิเมตริกแอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis:TGA)

เทคนิควิเคราะห์สมบัติทางความร้อนโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารเมื่อได้รับความร้อนภายใต้บรรยากาศที่กำหนด เป็นเทคนิคที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์สมบัติของวัสดุต่าง ๆ เช่น พอลิเมอร์ สารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ เซรามิก โลหะ แก้ว และวัสดุทั่วไปอื่น ๆ การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน เป็นการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของวัสดุที่ขึ้นกับอุณหภูมิและเวลา ผลการวิเคราะห์จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับ สมบัติทางความร้อน ความเสถียรต่อความร้อน และลักษณะการผ่านกระบวนการทางความร้อนของวัสดุ โดยทำการศึกษาน้ำหนักที่หายไปเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความร้อนที่วัสดุดูดหรือคาย เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือเวลา และการเปลี่ยนแปลงขนาดของวัสดุ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับก๊าซ หรือระเหยของน้ำ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเฟส หรือ การสลายตัวของวัสดุ (Decomposition) (Gooch, 1997)

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

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
3. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
5. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clean, รุ่น V 3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
6. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20 °C บริษัท Sanyo Electric, Japan
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -80 °C บริษัท Forma Scientific, USA
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert, Germany
9. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
10. เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Japan
11. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Japan
12. ตู้ป้อนเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert, Germany
13. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
14. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
15. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

16. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
17. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
18. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
19. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
20. เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer/hot plate) รุ่น 502P-2 บริษัท Mettler Toledo., USA
21. เครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟี รุ่น AKTA prime บริษัท Amersham pharmacia Biotech, U.S.A
22. คอลัมน์ XK 1.6 x 15 cm บริษัท Amersham pharmacia biotech wikstroms, Sweden
23. คอลัมน์ XK 1.6 x 60 cm บริษัท Amersham pharmacia biotech wikstroms, Sweden
24. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น MJ Mini personal thermal cycler บริษัท Bio-rad Laboratories, Ltd., USA
25. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี รุ่น 2000ES บริษัท Alltech, USA
26. คอลัมน์ Sugar SZ5532 บริษัท Shodex, Japan
27. เครื่อง Evaporative Light Scattering Detectors บริษัท Alltech, USA
28. เครื่อง Simultaneous thermal analyzer รุ่น 409 บริษัท Netzsch, Germany
29. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (FT-IR) รุ่น Spectrum One บริษัท Perkin Elmer ,USA
30. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (FT-NMR) รุ่น INOVA บริษัท Varian, Inc., USA

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. สารสกัดจากยีสต์ บริษัท Biospringer, France
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
4. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตเตตระไฮเดรต บริษัท Merck, Germany
5. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany
6. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
7. ซูโครส บริษัท Merck, Germany
8. กลูโคส บริษัท Sigma Chemical Co., USA
9. กาแลคโทส บริษัท Sigma Chemical Co., USA
10. แรมนอส บริษัท Difco, USA
11. แมนนอส บริษัท Fluka, Switzerland
12. โซไลส บริษัท Sigma Chemical Co., USA
13. เดกซ์แทรน 2000 บริษัท Amersham biosciences, Sweden
14. แชนแทน บริษัท Success chemical, Thailand
15. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต บริษัท Merck, German
16. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
17. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
18. แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
19. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
20. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
21. Gel filtration resin, superdex G-200 บริษัท Amersham pharmacia Biotech, U.S.A
22. Ion exchange resin, DEAE- cellulose บริษัท Amersham pharmacia Biotech, U.S.A
23. ฟีนอล บริษัท Merck, Germany
24. กรดไตรคลอโรอะซิติก บริษัท Merck, Germany
25. เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ บริษัท BDH chemicals, Ltd., England
26. ดินขาว (kaolin) บริษัท Mark, England
27. แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรีย สายพันธุ์ CU-CH4 CU-CH1 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ที่คัดแยกได้จากผลไม้ในสวน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยธิดารัตน์ วงศ์รัตน์ (2550) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้รับการถ่ายจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) และเสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ออกมาโดยนำมาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ด้วยการขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงจากอาหารสูตรข้างต้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ CU-CH4 CU-CH1 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเหลวของ สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่ดัดแปลงสูตรจาก Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 - 1.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกจากธรรมชาติ

3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อบริสุทธิ์ในข้อ 3.3.1.1 มาใช้เป็นหัวเชื้อโดยถ่ายแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 ปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.2.2 การผลิต สกัดแยก และการทำพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำแบคทีเรียมาตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เติมนกรดไตรคลอโรอะซิติกลงในส่วนน้ำไอเซลล์เพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเพื่อตกตะกอนโปรตีน (Lin และ Chien, 2007) ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และตะกอนโปรตีนออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนน้ำไอที่แยกได้ไปตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้เอทานอลเย็น ความเข้มข้น 95% โดยปริมาตรของเอทานอลที่ใช้เป็น 2 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำไอที่นำมาตกตะกอน เขย่า และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Kumar และคณะ, 2004) จะได้ตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์แยกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่น จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นปริมาตรเป็น 2 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer) หาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ และรายงานผลที่ได้ในหน่วยกรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จะทำให้พอลิแซ็กคาไรด์

บริสุทธิ์มากขึ้น โดยการนำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นแล้วตกตะกอนด้วยเอทานอลโดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ (Yokoi และคณะ, 1990) นำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer)

3.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.3.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.3.1.1 ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยกรดซัลฟูริก

นำพอลิแซ็กคาไรด์ 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปต้มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ นำไปผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน และเก็บสารละลายใส่ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (วิมลสิน ศิริพัฒนานนท์, 2549)

3.3.3.1.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ในงานวิจัยหัวข้อนี้ได้ใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ (Isocratic elution) และการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในช่วงเวลาการแยก (Gradient elution) เพื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ดังนี้

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา หรือ สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) ความเข้มข้นเริ่มต้น 90% โดยปริมาตรจนถึง 80%โดยปริมาตรในช่วงเวลา 30 นาที เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบกับชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์น้ำหนักประมาณ 20 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริกแอนาไลซิส (TGA) ด้วยเครื่อง Simultaneous Thermal Analyzer (STA) ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2004)

3.3.3.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์

ดำเนินการตามวิธีของ Tako และคณะ (1982) โดยนำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นใช้กระดาษกรองจุ่มลงในสารละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ต่อระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้หรือเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis)

3.3.3.4 ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (solubility test) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% จากนั้นดูความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ จากการละลายของตะกอนในน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3.5 ทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ในอัตราส่วน 1:1 นำไปเขย่าด้วยอัตรา 200 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไป

ปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของชั้นอิมัลชันไฟ ต่อระดับความสูงทั้งหมดตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) และติดตามวัดระดับความสูงของชั้นอิมัลชันไฟทุกวัน ตลอดระยะเวลา 14 วัน เพื่อติดตามความเสถียรของชั้นอิมัลชันไฟ

3.3.3.6 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์

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

3.3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม การหารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.4.1 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม

เปรียบเทียบลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูง และมีลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมในอุตสาหกรรม คือ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีความสามารถเป็นอิมัลชันไฟเออร์ สามารถละลายน้ำ มีความหนืด และมีความสามารถในการกักน้ำได้ดี

3.3.4.2 ศึกษาารูปแบบการเจริญ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4.1 ในอาหารเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) และเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาจนถึง 24 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (Velasco และคณะ, 2006) โดยนำอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil) ไปอบในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desiccator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด จากนั้นนำน้ำ

เลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก (ส่วนน้ำใส นำไปสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์) นำเซลล์มาใส่ในอะลูมิเนียมฟอยล์ข้างต้น และทำให้แห้งในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ซึ่งน้ำหนักแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และรายงานผลที่ได้ในหน่วยกรัมต่อลิตร และติดตามการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนน้ำใสมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 จากนั้นหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

3.3.5 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน

3.3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชูณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี หลังจากนั้นทำการย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธีย้อมสีแกรม เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.5.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี (Physiological characteristic and Biochemical test)

แปรผลการทดสอบต่างๆ โดยการอ้างอิงต่อคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974)

เตรียมแบคทีเรียที่มีอายุ 18-24 ชม. เชื้อโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารชนิดต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง McConkey ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ความสามารถในการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (Catalase test) ความสามารถในการผลิต indole (Indole test) การทดสอบ Methyl Red–Vogesprokauer tests (MR–VP test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test)

การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Lysine decarboxylase Lysine deaminase และ Ornithine decarboxylase ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (Urease test) และทดสอบความสามารถในการใช้ Malonate

3.3.5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

3.3.5.3.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ

3.3.4.1 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ เติมสารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme) เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (proteinase K) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 120 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) 220 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม นำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาณสุดท้าย กลับหลอดให้เข้ากันจนปรากฏสายดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตรและไรโบอาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 10

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.5.3.2 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.5.3.1 มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ เมื่ออะกาโรสแข็งตัววางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งที่ 1 จะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่เหมาะสม จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่เกินออกในน้ำกลั่นปลอดประจุ เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำได้โดย นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.3.5.3.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ซึ่งเป็น universal primers จำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิ

โมลาร์ $1 \times$ Taq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพโรเมอร์ความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี 3.3.5.3.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้

1. Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
2. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
3. Annealing step อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 1.30 นาที
4. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.5.3.2

3.3.5.3.4 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อการโคลน

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้งก่อน ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใส่ที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวเจอร์อันใหม่ เติมน้ำประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ถึง 50 ไมโครลิตรให้ลงตรงกลางแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.5.3.5 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

3.3.5.3.5.1 โลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

โลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.3.5.3.4 เข้ากับ พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

2x โลเกชันบัฟเฟอร์	5 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัม)	1 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.3.5.3.4 (ประมาณ 150 นาโนกรัม)	3 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร) ทำโลเกชันที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง	1 ไมโครลิตร

3.3.5.3.5.2 ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* JM109 และคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีขึ้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชั้นดีเอ็นเอแทรกสอด

ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่โลเกทไว้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* JM109 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลานาน 45 ถึง 50 นาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E.coli* JM109 ที่ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย X-gal (5-Bromo-4-

chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไว้ในที่มืด หลังจากเกลี่ยเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16 ถึง 24 ชั่วโมง

3.3.5.3.6 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเลี้ยง *E.coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดไมโครพิพจด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แชนลงยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มเหนียวและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมน้ำละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep Spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพจใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.5.3.7 การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1 ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>EcoRI</i>	0.5 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7.5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 % (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder

3.3.5.3.8 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy โดยส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมติก โดยใช้ไพรเมอร์ คือ M13F M13R และ 800R เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd) วิเคราะห์จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.3.5.3.9 สร้าง phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.572c ซึ่งประกอบไปด้วย

DNADIST.EXE NEIGHBOR.EXE SEQBOOT.EXE และ CONSENSE.EXE ตามลำดับ phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Kimura, 1980)

3.3.6 การทำบริสุทธิ์และการหาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

3.3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 1 มิลลิลิตร ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 200 ไมโครลิตร ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น เติมสารละลาย Coomassie blue (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบรินซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.6.3 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์แมล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride) ที่มี

ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง

3.3.6.4 ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี (พลอยพัฒนา นียมพลอย, 2551)

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และโหลดลงบน DEAE-cellulose คอลัมน์ และชะสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำกลั่นและตามด้วยเกรเดียนต์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นจาก 0 ถึง 2 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บลำดับส่วนปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด และนำมาวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol sulfuric acid จากนั้นเก็บลำดับส่วนหลักที่มีน้ำตาลมาไดเอไลซ์และทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ จากนั้นนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดย DEAE-cellulose anion exchange chromatography มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร มาทำบริสุทธิ์ต่อโดยโหลดลงบน Superdex G-200 คอลัมน์ และชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บลำดับส่วนปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด และนำมาวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol sulfuric acid จากนั้นเก็บส่วนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์มาทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ

3.3.6.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี (Gel permeation chromatography)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบมวลโมเลกุลโดยเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพา (Mobile phase) เป็นน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย refractive index detector ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และทำการเปรียบเทียบ

เวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับสารมาตรฐานเดกซ์แทรน (Smitinont และคณะ, 1999)

3.3.6.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy)

นำพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาณ 2 มิลลิกรัม มาบดผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ปริมาณ 150 มิลลิกรัม แล้วอัดเป็นก้อนกลม (pellet) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy)

3.3.6.7 การศึกษาโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์โดย $^1\text{H-NMR}$ สเปกโทรสโกปี

นำพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาณ 7 มิลลิกรัมมาละลายในดิวเทอเรียมออกไซด์ (D_2O) 1 มิลลิลิตร และนำมาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

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

นำสารละลายแขวนลอยดินขาว (Kaolin clay) ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยมีการแปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นทำการดูต่อน้ำใสชั้นบน (upper phase) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ชุดควบคุมใช้

น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) จากสูตรข้างล่างดังนี้

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

3.3.6.9 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมัน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Cooper และ Goldenberg, 1987)

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์จากระดับความสูงของชั้นอิมัลชันไฟ และคำนวณหา ค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ (Emulsification index (E_{24})) จากสูตรข้างล่าง ดังนี้

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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกจากธรรมชาติ

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร (ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.8 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แบคทีเรียสายพันธุ์	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)
CU- CH1	1.762
CU- CH4	2.380
CU-E3	0.466
CU-F6	0.222
CU-M2	1.210
CU-M4	1.198
CU-M5	0.064

จากตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด โดยสามารถผลิตพอลิ

แซ็กคาไรด์ 2.380 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ตามวิธีในข้อ 3.3.3.1.1 แล้วนำไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 เทียบกับน้ำตาลมาตรฐานตามวิธีในข้อ 3.3.3.1.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

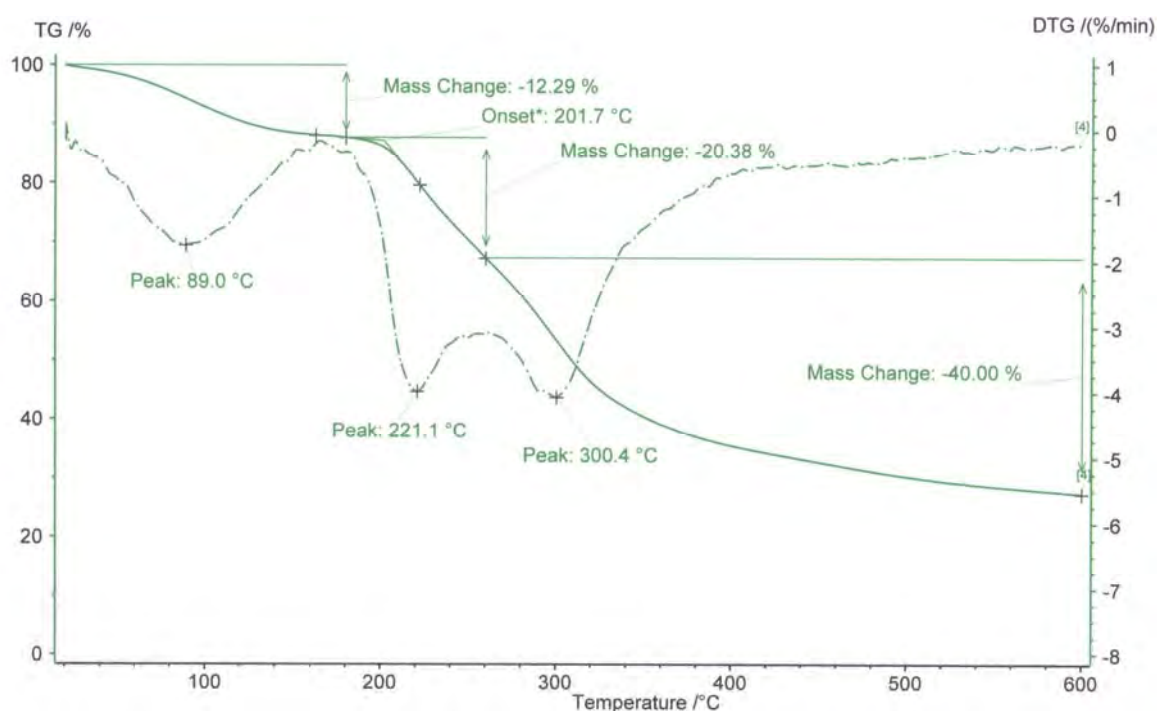
ตารางที่ 4.2 แสดงชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 จากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
CU- CH1	แรมโนส, แมนโนส, กลูโคส
CU- CH4	แรมโนส, กลูโคส, กาแลกโทส
CU-E3	แรมโนส, กลูโคส, กาแลกโทส
CU-F6	แรมโนส, ไซโลส, กลูโคส, กาแลกโทส
CU-M2	แรมโนส, แมนโนส, กาแลกโทส
CU-M4	แรมโนส, แมนโนส, กาแลกโทส
CU-M5	แมนโนส

จากตารางที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ และแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ของแมนโนส

4.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์โดยการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมตริก (TGA)

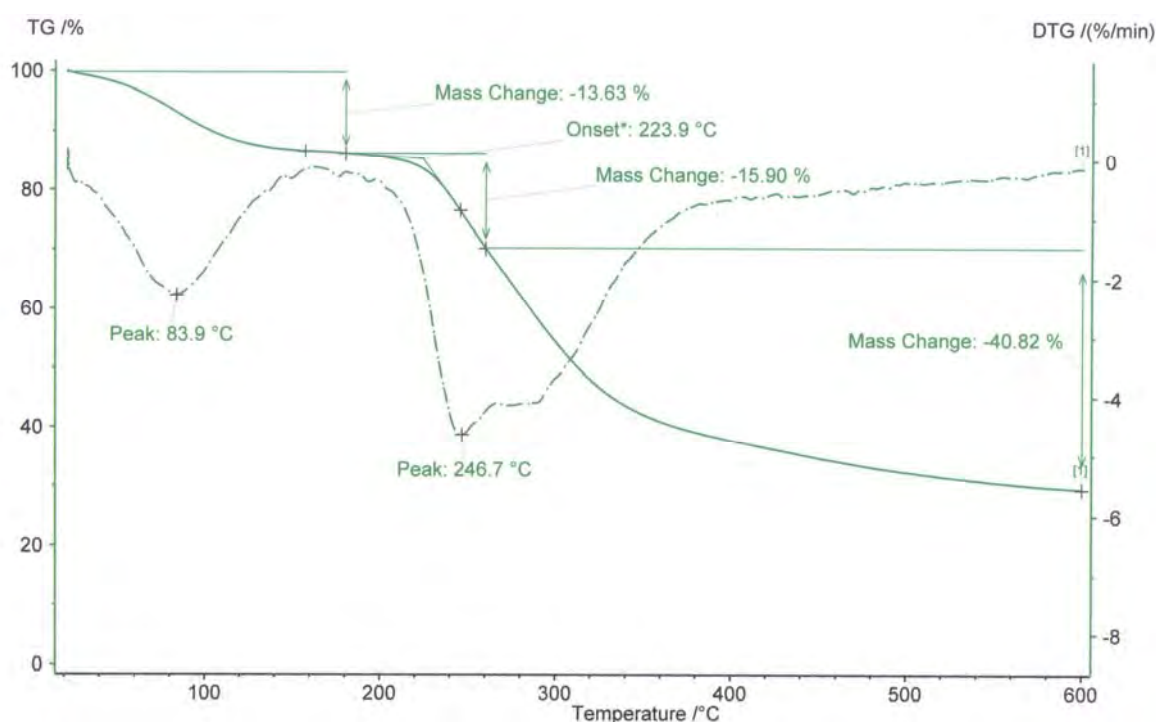
จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 และ 4.7



รูปที่ 4.1 โคจรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.1 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย (decomposition stage) 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียสพบการลดลงของน้ำหนัก 12.29% เนื่องจากการสูญเสียน้ำหนักหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 202 องศาเซลเซียสจนถึง 240 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง

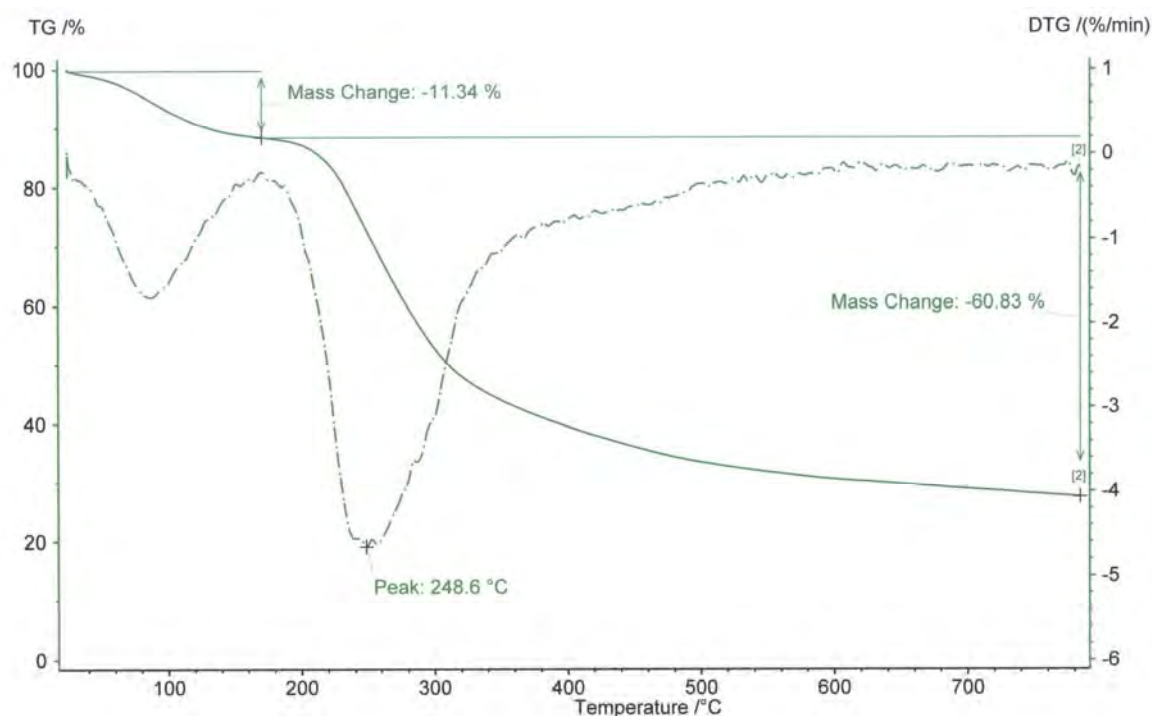
อย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20.38% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 280 – 400 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 40 %



รูปที่ 4.2 โคจรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายได้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 แสดงดังรูปที่ 4.2 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 3 ขั้นตอนเช่นกัน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียสพบการลดลงของน้ำหนัก 13.63% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 224 องศาเซลเซียสจนถึง 270 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง

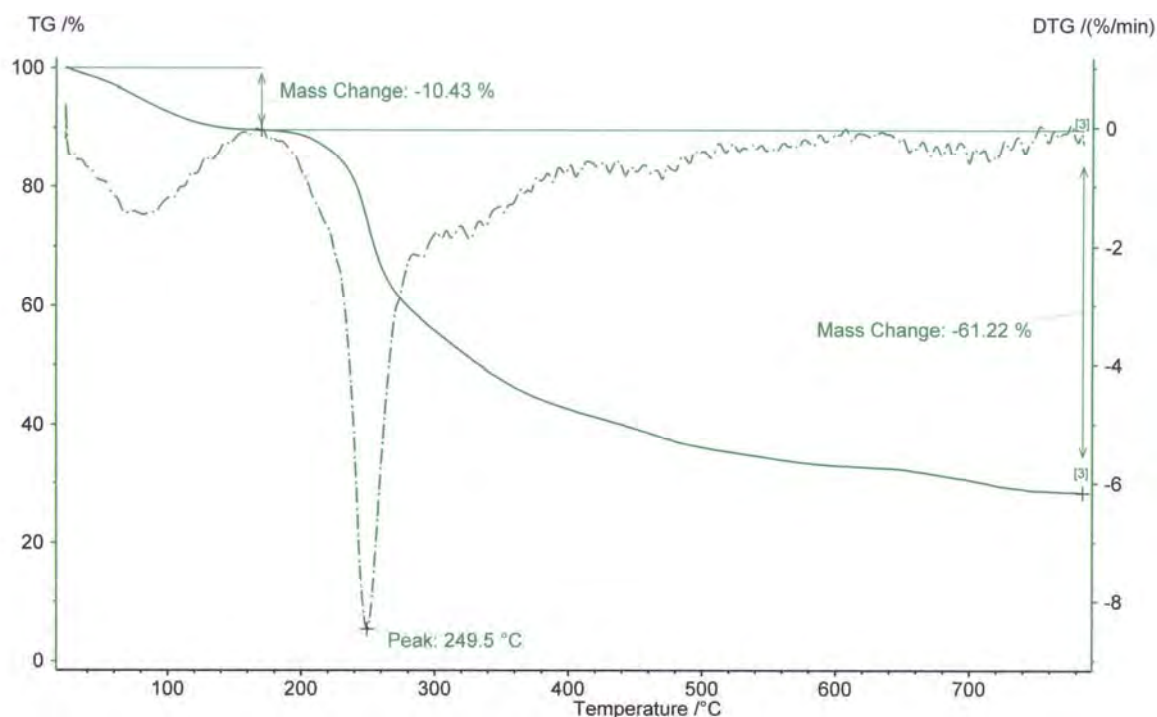
อุณหภูมิ 247 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 15.90% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 280 – 390 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 40.82 %



รูปที่ 4.3 โคจรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-E3 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

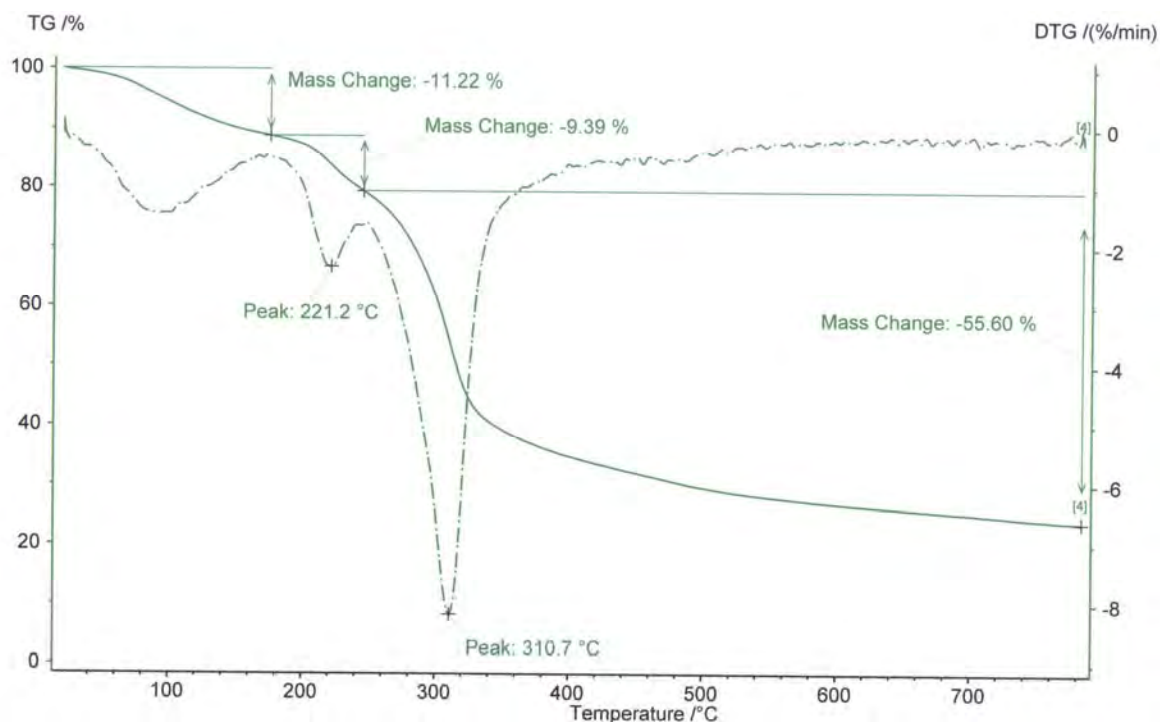
สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย CU-E3 พบว่ามีขั้นตอนกระบวนการสลายเพียง 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียสพบการลดลงของน้ำหนัก 11.34% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียสจนถึง 390 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 249 องศาเซลเซียส

โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 60.83% ดังแสดงในรูปที่ 4.3



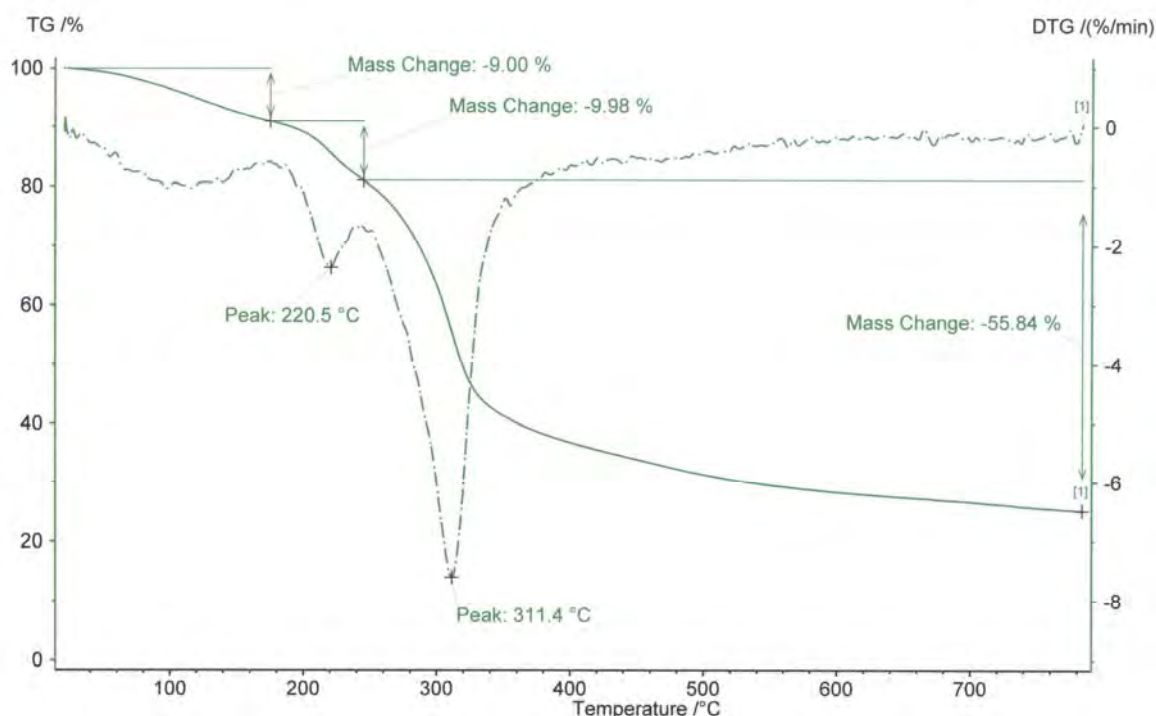
รูปที่ 4.4 โคจรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-F6 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.4 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย CU-F6 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียสพบการลดลงของน้ำหนัก 10.43% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียสจนถึง 380 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 61.22%



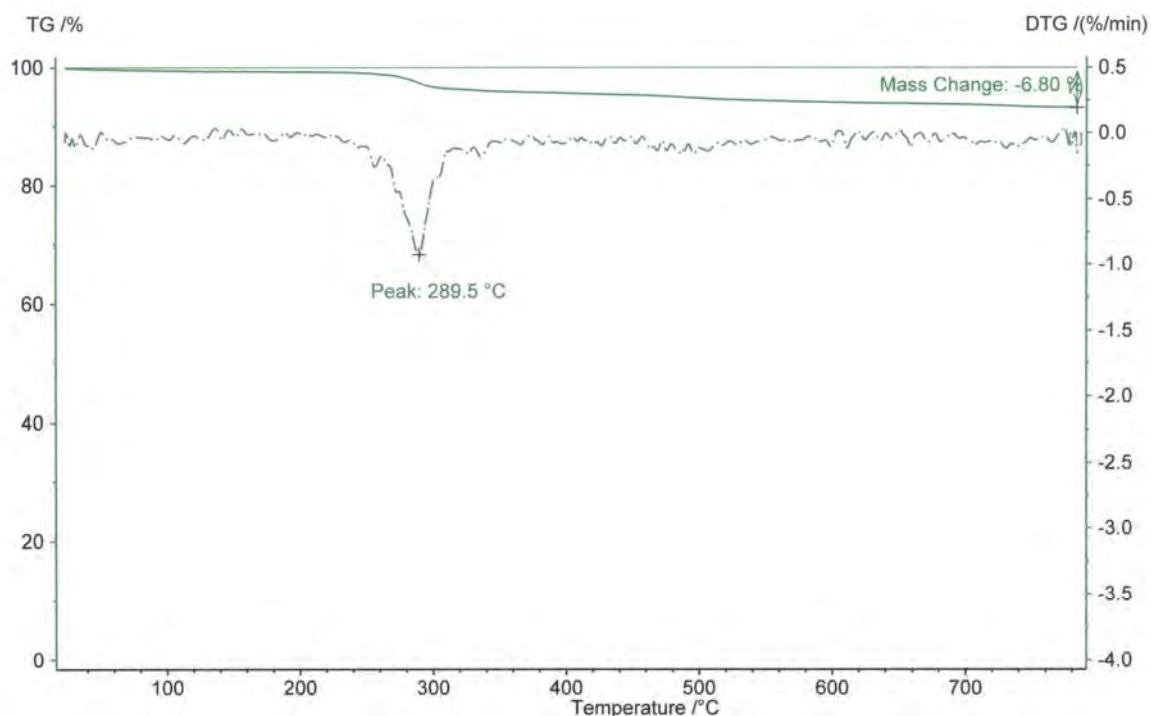
รูปที่ 4.5 โคจรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M2 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M2 พบว่ามีขั้นตอนกระบวนการสลาย 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียสพบการลดลงของน้ำหนัก 11.22% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสจนถึง 240 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 9.39% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 260 – 400 องศาเซลเซียสและน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 311 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 55.60 % ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.6 โคจรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M4 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M4 แสดงดังรูปที่ 4.6 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียส พบการลดลงของน้ำหนัก 9 % เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสจนถึง 240 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 9.98% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 260 – 400 องศาเซลเซียสและน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 311 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 55.84 %



รูปที่ 4.7 โคโรมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 800 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.7 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 มีขั้นตอนกระบวนการสลายเพียง 1 ขั้นตอน โดยพบว่าเริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียสจนถึง 320 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ตลอดกระบวนการมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 6.80%

โดยสรุปจากการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมตริกพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งหมด 7 สายพันธุ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายตั้งแต่ 200-400 องศาเซลเซียส โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-M2 CU-M4 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 3 ขั้นตอน พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-E3 CU-F6 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน และพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 มีขั้นตอนกระบวนการสลายเพียง 1 ขั้นตอน

4.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ความเข้มข้น 0.5% มาวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.3.3 โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ต่อระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้ หรือเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) สำหรับการแปลผลนั้นหากเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำจะแสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง ผลการทดลองได้แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์
CU- CH1	64.73%
CU- CH4	18.72%
CU-E3	77.74%
CU-F6	84.47%
CU-M2	72.09%
CU-M4	74.83%
CU-M5	89.04%
แซนแทน	5.71%

จากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำสุดที่ 18.72% แสดงว่ามีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงสุด ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการอุ้มน้ำของแซนแทน

พบว่า แชนแทนสามารถอุ้มน้ำได้สูงกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ของสายพันธุ์ CU-CH4 ประมาณ 3 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.2.4 ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (solubility test) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% แล้วดูความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์จากการละลายของตะกอนในน้ำ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 และ CU-M5ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 แสดงสมบัติที่ดีคือสารละลายมีความข้นหนืด ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์อื่นต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียสในการละลาย ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.1% ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์
CU- CH1	ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด
CU- CH4	ละลายน้ำดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด
CU-E3	ใช้อุณหภูมิสูง100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา30นาที สารละลายได้บางส่วน
CU-F6	ใช้อุณหภูมิสูง100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา30นาที สารละลายได้บางส่วน
CU-M2	ใช้อุณหภูมิสูง100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา30นาที สารละลายน้ำได้สมบูรณ์
CU-M4	ใช้อุณหภูมิสูง100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา30นาที สารละลายน้ำได้สมบูรณ์
CU-M5	ละลายน้ำดีที่อุณหภูมิห้อง

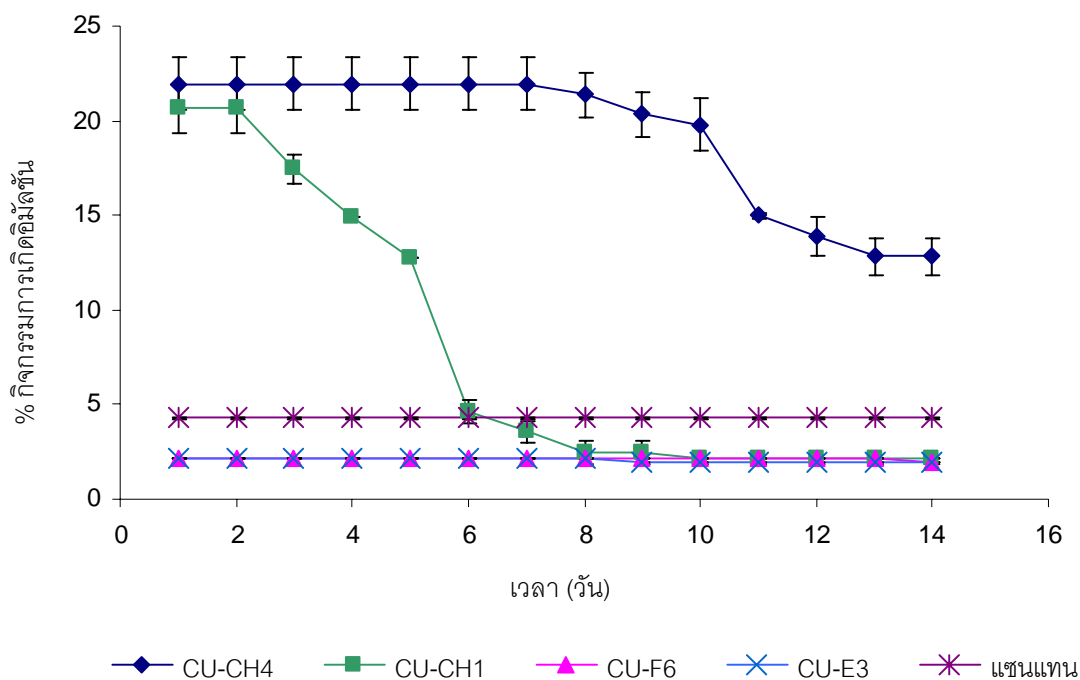
4.2.5 ทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

จากการนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีในข้อ 3.3.3.5 โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟต์ต่อระดับความสูงทั้งหมด หรือร้อยละของกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน และติดตามวัดระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟต์ทุกวัน ตลอดระยะเวลา 14 วัน เพื่อติดตามความเสถียรของอิมัลชัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช ในอัตราส่วน 1:1

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์
CU-CH1	20.65%
CU-CH4	21.94%
CU-E3	2.14%
CU-F6	2.16%
CU-M2	0%
CU-M4	0%
CU-M5	0%
แซนแทน	4.27%

จากตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของแซนแทน พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่าแซนแทน



รูปที่ 4.8 ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 และแซนแทน ตลอดระยะเวลา 14 วัน

รูปที่ 4.8 แสดงความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดจากพอลิแซ็กคาไรด์ในระยะเวลา 14 วัน พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 พบว่าความเป็นอิมัลชันไฟเออร์เริ่มลดลงหลังจากวันที่ 2 อย่างต่อเนื่องจนถึง 2.14% ความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีการลดลงที่ช้ากว่าคือเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 7 และมีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 12.83% ความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-E3 เริ่มลดลงหลังจากวันที่ 8 โดยความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์เหลือ 1.92% และความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-F6 เริ่มลดลงหลังจากวันที่ 13 โดยความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ลดลงเหลือ 1.95% ส่วนความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของแซนแทนคงที่ตลอดระยะเวลา 14 วัน ในทั้งหมดนี้จากการติดตามความเสถียรของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นระยะเวลา 14 วันพบว่าความสามารถการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ยังคงมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ

4.2.6 การวิเคราะห์ความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เมื่อละลายน้ำแล้วเกิดลักษณะข้นหนืดมาวัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Viscometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าความหนืดของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ค่าความหนืด (cps)
CU-CH4	14.5
CU-CH1	17
แซนแทน	40.6

จากตารางที่ 4.6 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 และ CU-CH1 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ของสายพันธุ์ CU-CH1 มีความหนืดสูงกว่าสายพันธุ์ CU-CH4 แต่ต่ำกว่าของแซนแทนมาก

4.3 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมและศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.3.1 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม

เปรียบเทียบลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้งหมด 7 สายพันธุ์ แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูง มีลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมในอุตสาหกรรม คือ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สามารถละลายน้ำ มีความหนืดและมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี

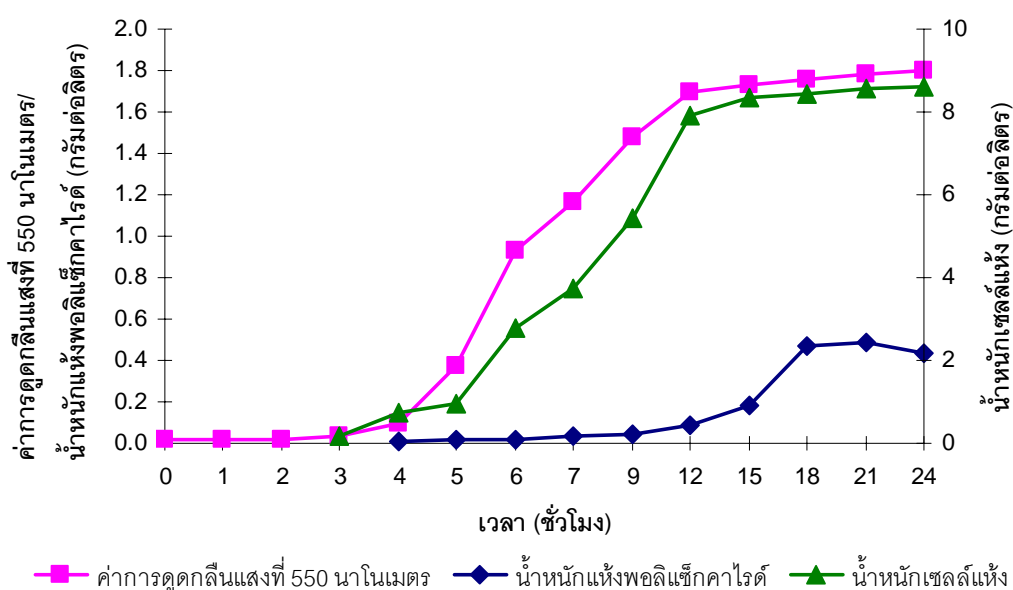
จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น โดยมีการผลิตสูงถึง 2.380 กรัมต่อลิตร และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมในอุตสาหกรรม คือ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สามารถละลายน้ำและเกิดลักษณะขุ่นหนืด และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีเมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มาทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.7 ลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5

แบคทีเรียสายพันธุ์	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิการย่อยสลาย	ชนิดน้ำตาล	%กิจกรรมอิมัลชัน	% อัตราการสกัดของเหลวจากเจล	การละลายน้ำ	ค่าความหนืด (cps)
CU- CH1	1.762	202 ^o ซ - 240 ^o ซ 280 ^o ซ - 400 ^o ซ	แรมโนส, แมนโนส, กลูโคส	20.65%	64.73%	ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด	17
CU- CH4	2.380	224 ^o ซ - 270 ^o ซ 280 ^o ซ - 390 ^o ซ	แรมโนส, กลูโคส, กาแลคโทส	21.94%	18.72%	ละลายน้ำดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด	14.5
CU-E3	0.466	220 ^o ซ - 390 ^o ซ	แรมโนส, กลูโคส, กาแลคโทส	2.14%	77.74%	ใช้อุณหภูมิสูง (100 ^o ซ~30นาที) สารละลายได้บางส่วน	-
CU-F6	0.222	230 ^o ซ - 380 ^o ซ	แรมโนส, ไซโลส, กลูโคส, กาแลคโทส	2.16%	84.47%	ใช้อุณหภูมิสูง (100 ^o ซ~30นาที) สารละลายได้บางส่วน	-
CU-M2	1.210	200 ^o ซ - 240 ^o ซ 260 ^o ซ - 400 ^o ซ	แรมโนส, แมนโนส, กาแลคโทส	0%	72.09%	ใช้อุณหภูมิสูง (100 ^o ซ~30นาที) สารละลายน้ำได้สมบูรณ์	-
CU-M4	1.198	200 ^o ซ - 240 ^o ซ 260 ^o ซ - 400 ^o ซ	แรมโนส, แมนโนส, กาแลคโทส	0%	74.83%	ใช้อุณหภูมิสูง (100 ^o ซ~30นาที) สารละลายน้ำได้สมบูรณ์	-
CU-M5	0.064	270 ^o ซ - 320 ^o ซ	แมนโนส	0%	89.04%	ละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้อง	-

4.3.2 รูปแบบการเจริญ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ในอาหารเหลวที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยนำหนักต่อปริมาตร และติดตามการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 รูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ในอาหารเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหวิโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยนำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.9 แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 เริ่มผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระยะทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 4 โดยพิจารณารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พบว่าเป็นแบบเมตาบอลิซึมภูมิที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์พร้อมกับการเจริญ โดยมีปริมาณการผลิตสูงสุดที่ช่วงการเจริญคงที่ หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน

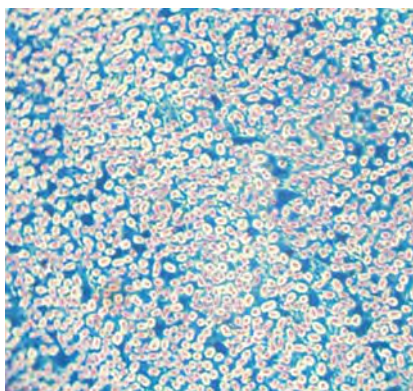
4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 พบว่า ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหวิโรจน์ฤทธิ์ (2551) มีลักษณะกลม สีขาวครีม ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างแท่งสั้น และติดสีแกรมลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหวิโรจน์ฤทธิ์ (2551) มาย้อมสีดูลักษณะแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า แคปซูลมีลักษณะขาวใสห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ลักษณะแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.4.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี (Physiological characteristic and Biochemical test)

เมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยทำการทดสอบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในอาหารได้ จึงมีโคโลนีสีชมพู และมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม ดังแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 บนอาหารแข็ง MacConkey

จากรูปที่ 4.12 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* จึงทำการทดสอบทางชีวเคมีสำหรับแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4

การทดสอบ	แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4
Motility	-
Oxidase	-
Catalase	+
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	+
Citrate (Simmons)	+
TSI reaction	A/A
H ₂ S production (TSI)	-
Lysine decarboxylase	+
Lysine deaminase	+
Ornithine decarboxylase	-
Urease	+
Malonate	+
การทดสอบความสามารถในการใช้ คาร์โบไฮเดรต	
กลูโคส	+
กาแลคโทส	+
ฟรักโทส	+
แมนนิทอล	+
มอลโทส	+
ซูโครส	+
ซอร์บิทอล	+

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ, A/A สร้างกรดและก๊าซ

จากตารางที่ 4.8 พบว่าจากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology โดยพิจารณาจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* sp.

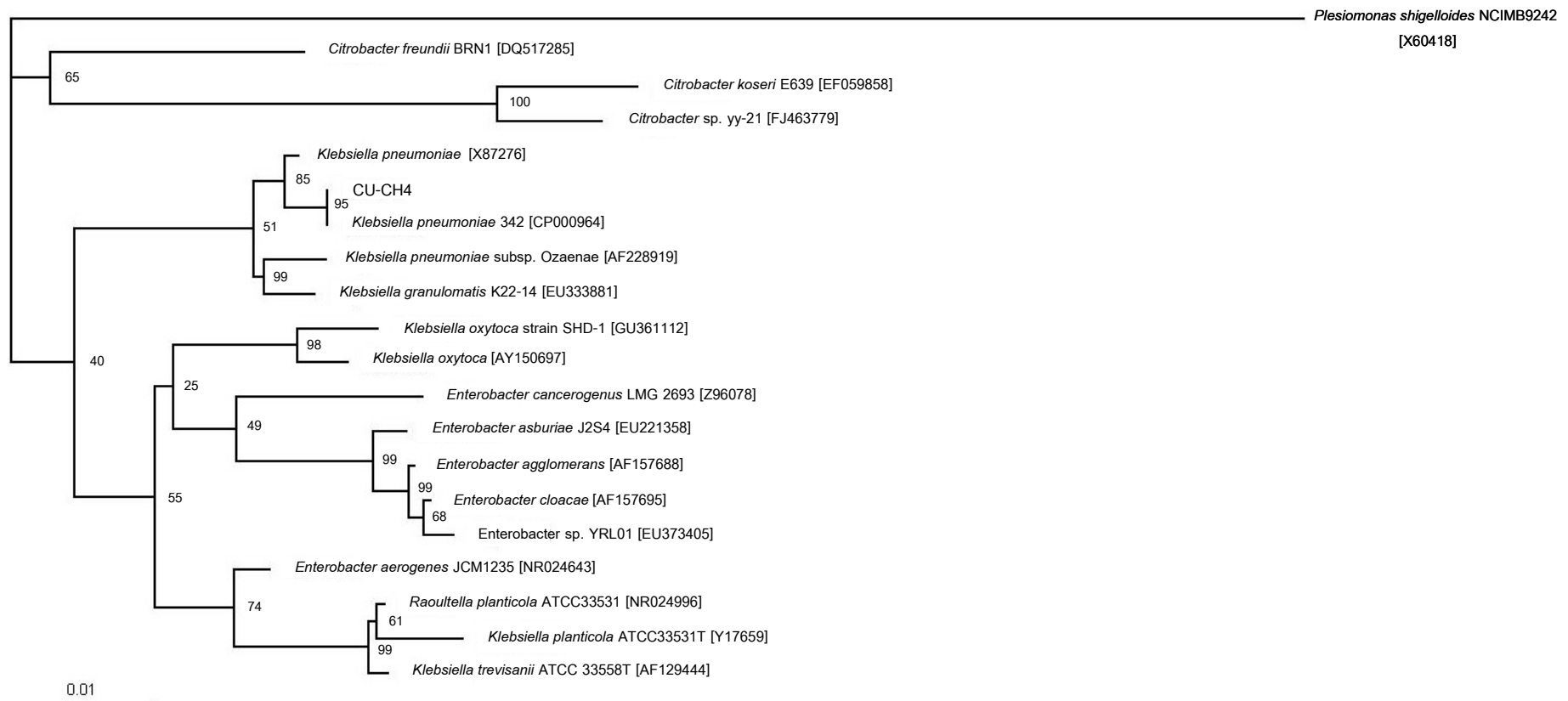
4.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ตามวิธีในข้อ 3.3.5.3 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ความยาว 1,504 bp เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* 99% ถึง 100% ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
<i>Klebsiella pneumoniae</i> สายพันธุ์ 342	CP000964	100%	Fouts และคณะ, 2008
<i>Klebsiella variicola</i> สายพันธุ์ At-22	CP001891	99%	Pinto-Tomas และคณะ, 2009
<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ D3S	GU259534	99%	Samaddar และคณะ, 2009
<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ P2	AB114634	99%	Meunchang และคณะ, 2003
<i>Klebsiella pneumoniae</i> สายพันธุ์ 211	GQ259887	99%	Xia และคณะ, 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i> สายพันธุ์ HDMB-X	GQ214541	99%	Luo และคณะ, 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X87276	99%	Ludwig และคณะ, 1995

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ CU-CH4 และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลที่ผ่านมาการปรับแนวมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ 342 อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อนี้คือ *Klebsiella pneumoniae* จึงเรียกแบคทีเรียนี้ว่า *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4



รูปที่ 4.13 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Plesiomonas shigelloides* สายพันธุ์ NCIMB9242 เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap

4.5 การทำบริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์

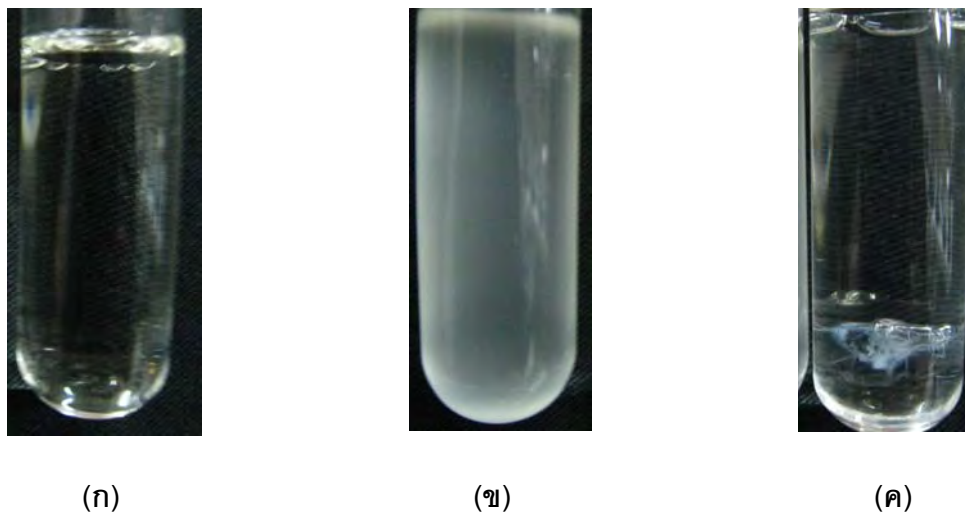
เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 87.5%

4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ทำการละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ 2.8 %

4.5.3 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มาวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.6.3 พบว่าสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เกิดตะกอนสีขาวเมื่อเติมสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ลงไป ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับแทนแทนซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวกของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบดังแสดงในรูปที่ 4.14 ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ CU-CH4 จึงเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประจุลบ (Acidic polysaccharide) และเมื่อนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน แล้วนำส่วนน้ำใสไปตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีตะกอนเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยแสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์ตัวเดียวกันมีส่วนประกอบของส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) เล็กน้อย

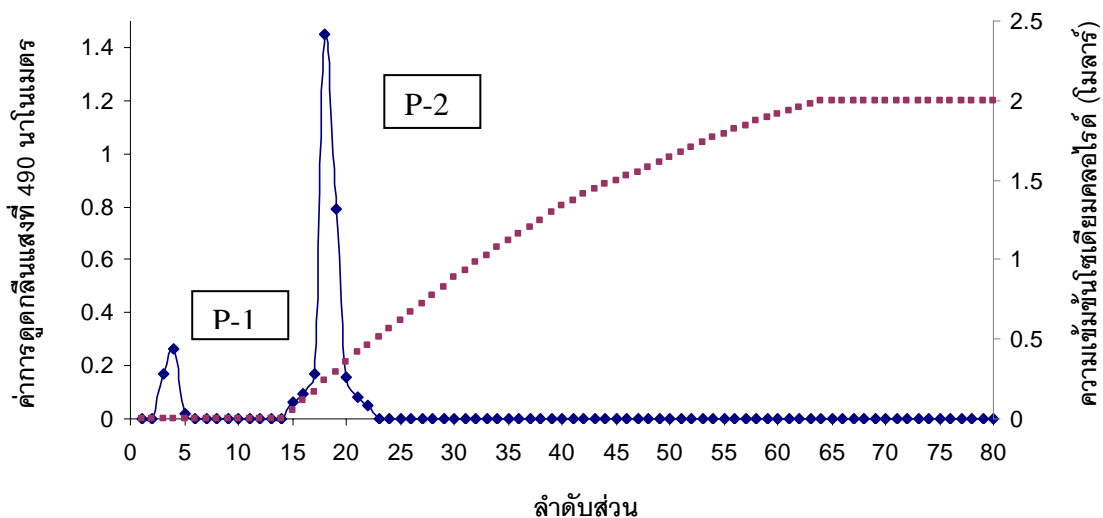


รูปที่ 4.14 ลักษณะตะกอนสีขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ภายหลังจากเติมสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์แมล

- (ก) 10% สารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์กับโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์แมล (ชุดควบคุมผลลบ)
- (ข) สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4
- (ค) สารละลายแซนแทน (ชุดควบคุมผลบวก)

4.5.4 ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี

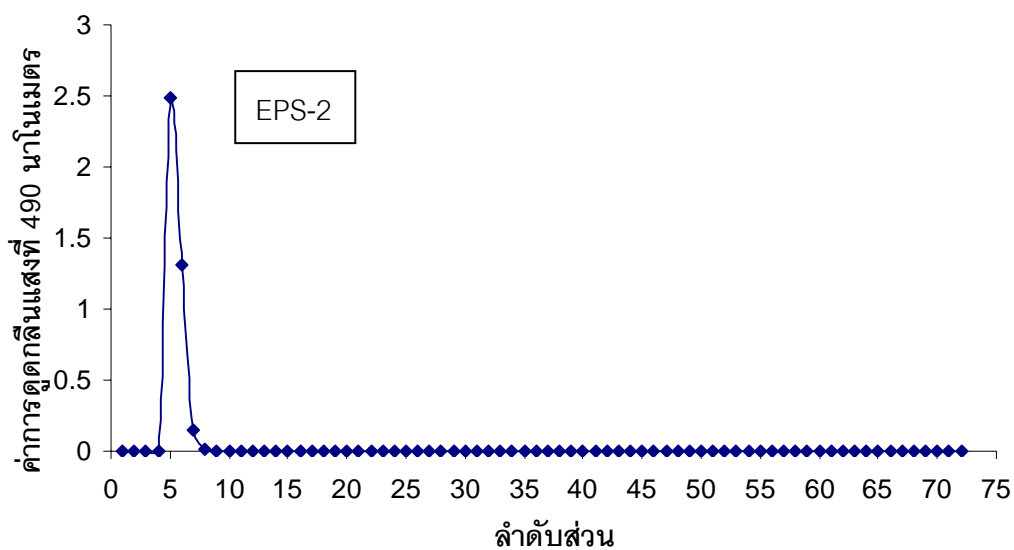
เมื่อนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โหลดลงบน DEAE-cellulose คอลัมน์ และชะสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำกลั่นและเกรเดียนต์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นจาก 0 ถึง 2 โมลาร์ ตามวิธีในข้อ 3.3.6.4 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมการทำบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบบน DEAE-cellulose คอลัมน์ ชะสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำกลั่นและเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นจาก 0 ถึง 2 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.15 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 แสดงลำดับส่วน 2 ส่วนได้แก่ ส่วน P-1 ซึ่งมีปริมาณน้อยที่ไม่ถูกดูดซับโดยเรซิน (unabsorbed fraction) และชะออกได้ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งเป็นลำดับส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) และลำดับส่วนหลัก P-2 ที่มีปริมาณมากที่ดูดซับได้โดยเรซิน (absorbed fraction) และชะออกโดย NaCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.25 โมลาร์ ซึ่งเป็นลำดับส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ประจุลบ (acidic polysaccharide)

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ P-2 ซึ่งเป็นลำดับส่วนหลัก (main fraction) มาละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำบริสุทธิ์ต่อโดยโพลดลงบน Superdex G-200 คอลัมน์ และชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น ตามวิธีในข้อ 3.3.6.4 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.16

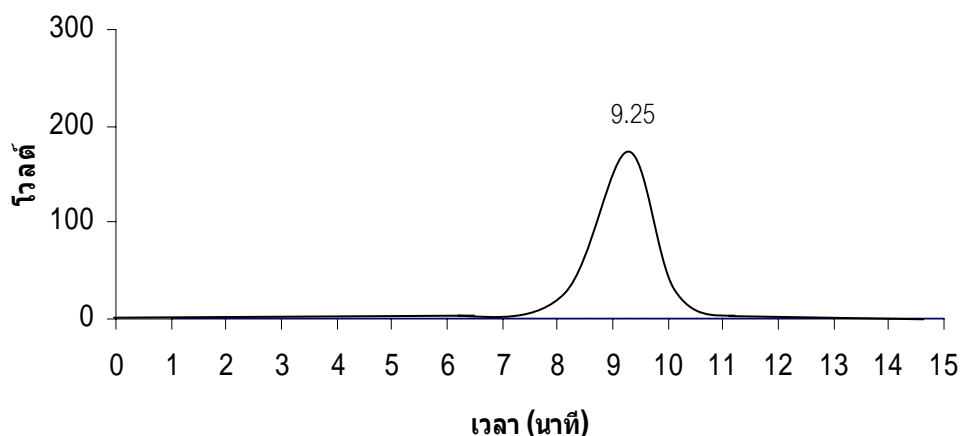


รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมการทำบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ P-2 โดยเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีบน Superdex G-200 คอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

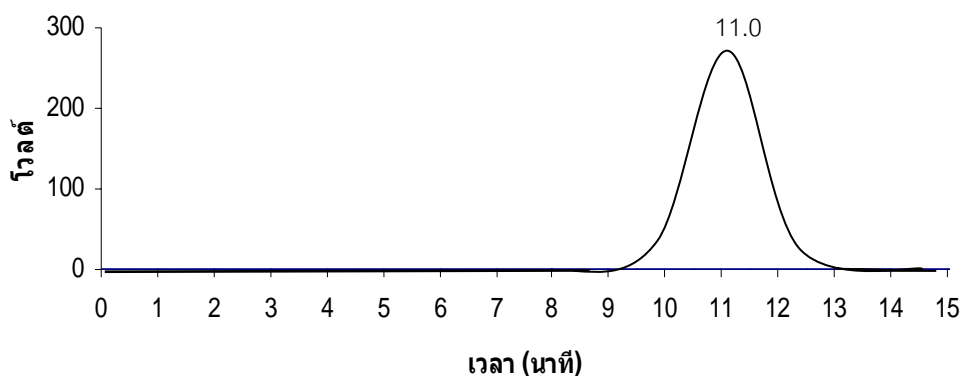
จากรูปที่ 4.16 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ P-2 เมื่อผ่าน Superdex G-200 คอลัมน์ แล้วให้ลำดับส่วนหลัก EPS-2 ซึ่งมีพีค (peak) เดียวเท่านั้น จึงเก็บลำดับส่วนหลัก EPS-2 เพื่อศึกษาสมบัติต่อไป

4.5.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี (GPC)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบมวลโมเลกุลโดยเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี (GPC) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.5 และเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับสารมาตรฐานเดกซ์แทรน (Dextran) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17 และ 4.18



รูปที่ 4.17 โครมาโทแกรมของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

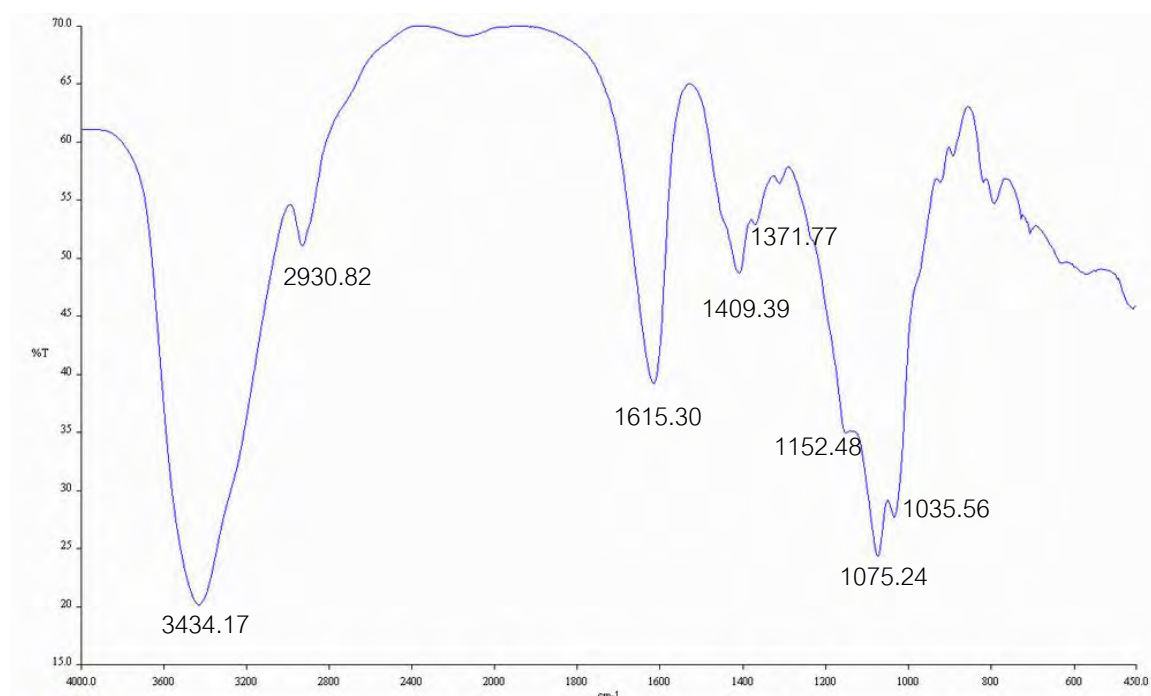


รูปที่ 4.18 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเดกซ์แทรน T2000 มวลโมเลกุล 2×10^6 ดาลตัน จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เมื่อทำการเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 กับ สารมาตรฐานเดกซ์แทรน T2000 ดังแสดงในรูปที่ 4.17 และ 4.18 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มีมวลโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน และเมื่อเปรียบเทียบกับสารหามวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีบน Superdex G-200 คอลัมน์ กับ เดกซ์แทรน T2000 พบว่าสารถูกชะออกมาที่ลำดับส่วนในช่วงเดียวกัน แสดงว่ามวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 อาจใกล้เคียงกันกับเดกซ์แทรน T2000

4.5.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลของพอลิแซ็กคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ปริมาณ 2 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลโดยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.6 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.19

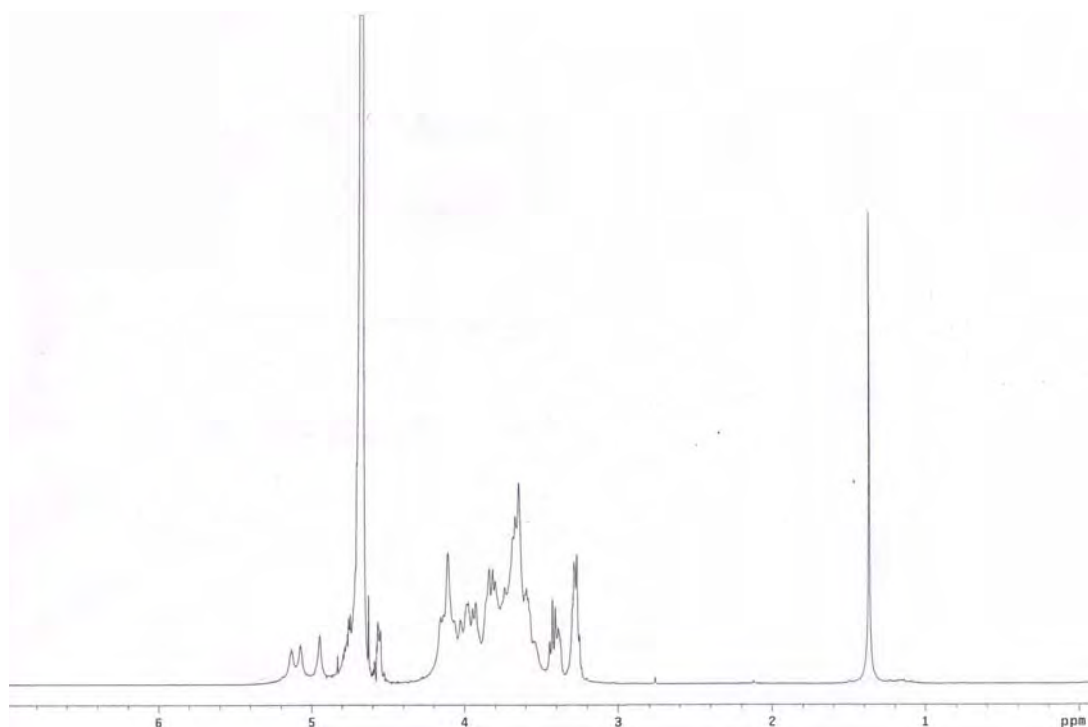


รูปที่ 4.19 สเปกตรัมของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy)

จากรูปที่ 4.19 พบว่าจากสเปกตรัมของ EPS-2 ยืนยันว่า EPS-2 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ โดยช่วงการดูดกลืนแสงระหว่าง $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ แสดง O-H stretching ในหน่วยของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 แสดงพีค (peak) ที่ 3434.17 cm^{-1} และช่วงการดูดกลืนแสงที่ 2930.82 cm^{-1} ของ EPS-2 แสดง C-H stretching ในวงแหวนน้ำตาล และแสดง asymmetrical stretching band ที่ 1615.30 cm^{-1} และช่วงการดูดกลืนแสงที่ 1350 จนถึง 1480 cm^{-1} แสดง C-H bending ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 แสดงพีคที่ 1371.77 cm^{-1} และ 1409.39 cm^{-1} ช่วงการดูดกลืนแสงที่ $1300 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงพันธะ C-O ของพอลิแซ็กคาไรด์

4.5.7 ศึกษาโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์โดย $^1\text{H-NMR}$ สเปกโทรสโกปี

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มมิกเวสเคิลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.7 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.20



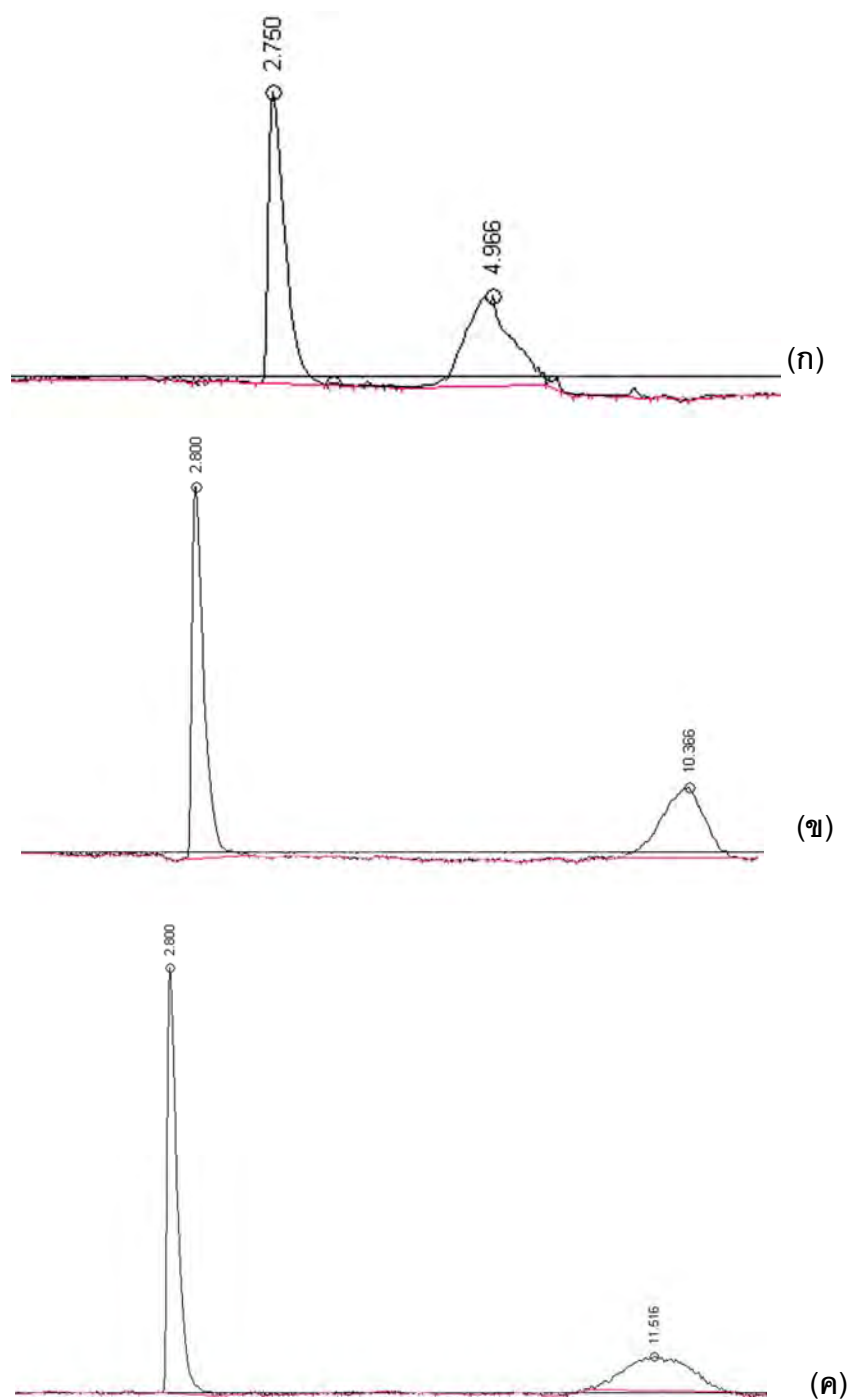
รูปที่ 4.20 สเปกตรัมของพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มมิกเวสเคิลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (FT-NMR) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.20 พบว่ามี 5 สัญญาณที่ชัดเจนในช่วง δ 4.5-5.5 ซึ่งเป็นสัญญาณของ anomeric proton ที่ตำแหน่ง $\delta = 4.56, 4.62, 4.94, 5.07$ และ 5.13 ppm และที่ตำแหน่ง $\delta = 1.36$ ppm แสดงสัญญาณที่ชัดเจนซึ่งเป็นสัญญาณโปรตอนจากหมู่เมทิลของน้ำตาล และที่ตำแหน่ง $\delta = 4.67$ ppm แสดงสัญญาณที่หนาแน่นของโปรตอนจากน้ำ (HOD) ทำให้เห็นสัญญาณของ β -anomeric proton ที่ $\delta 4.74$ ไม่ชัดเจน และสัญญาณที่ทับซ้อนกันของโปรตอนที่ $\delta 4.75$ และ 4.74 แสดง β -configuration สัญญาณของ anomeric proton ที่ตำแหน่ง $\delta > 5$

ppm แสดงสัญญาณของหน่วยของน้ำตาลเฮกไซส (C6) เชื่อมต่อกันแบบ β -D-configuration และที่ตำแหน่ง $\delta = 3-4$ ppm แสดงสัญญาณของ non-anomeric proton

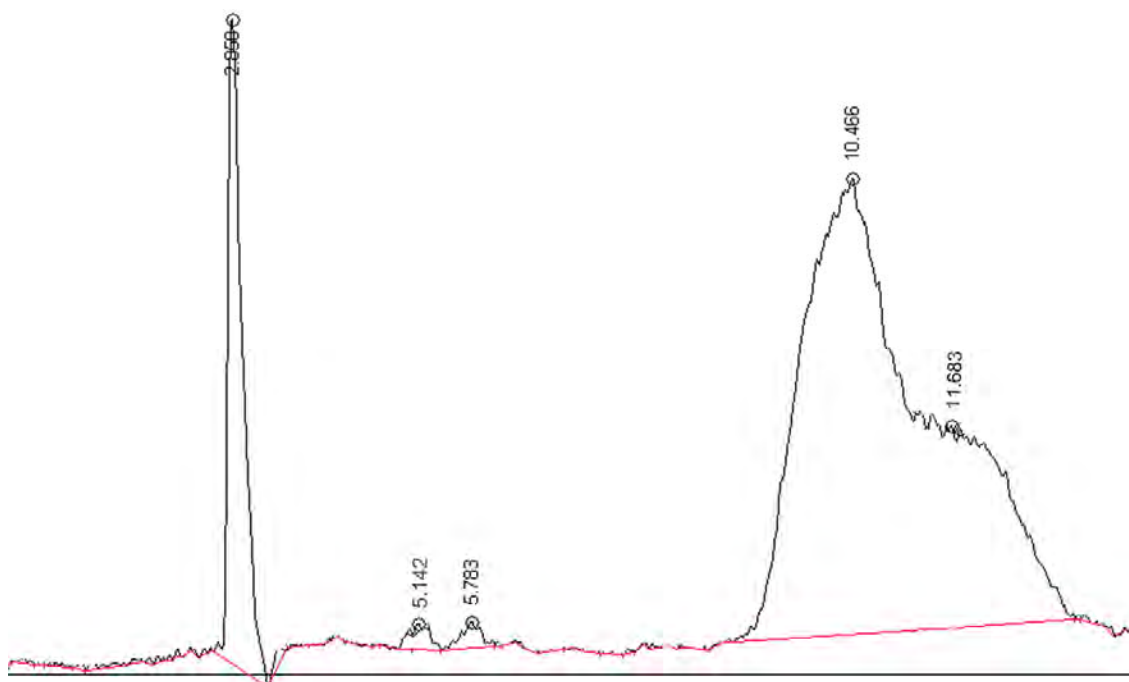
4.5.8 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มาย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ตามวิธีในข้อ 3.3.3.1.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.3.1.2 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.21 4.22 และ 4.23

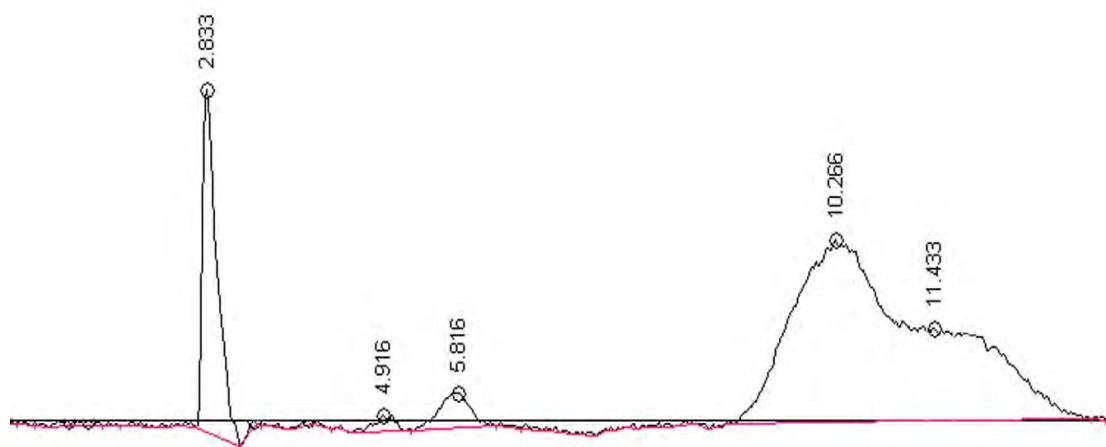


รูปที่ 4.21 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (แฟร็กโทส กลูโคส และกาแลคโทส) โดยใช้อะซิโตนไนไตรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

- (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลแฟร็กโทส
- (ข) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส
- (ค) สารมาตรฐานน้ำตาลกาแลคโทส



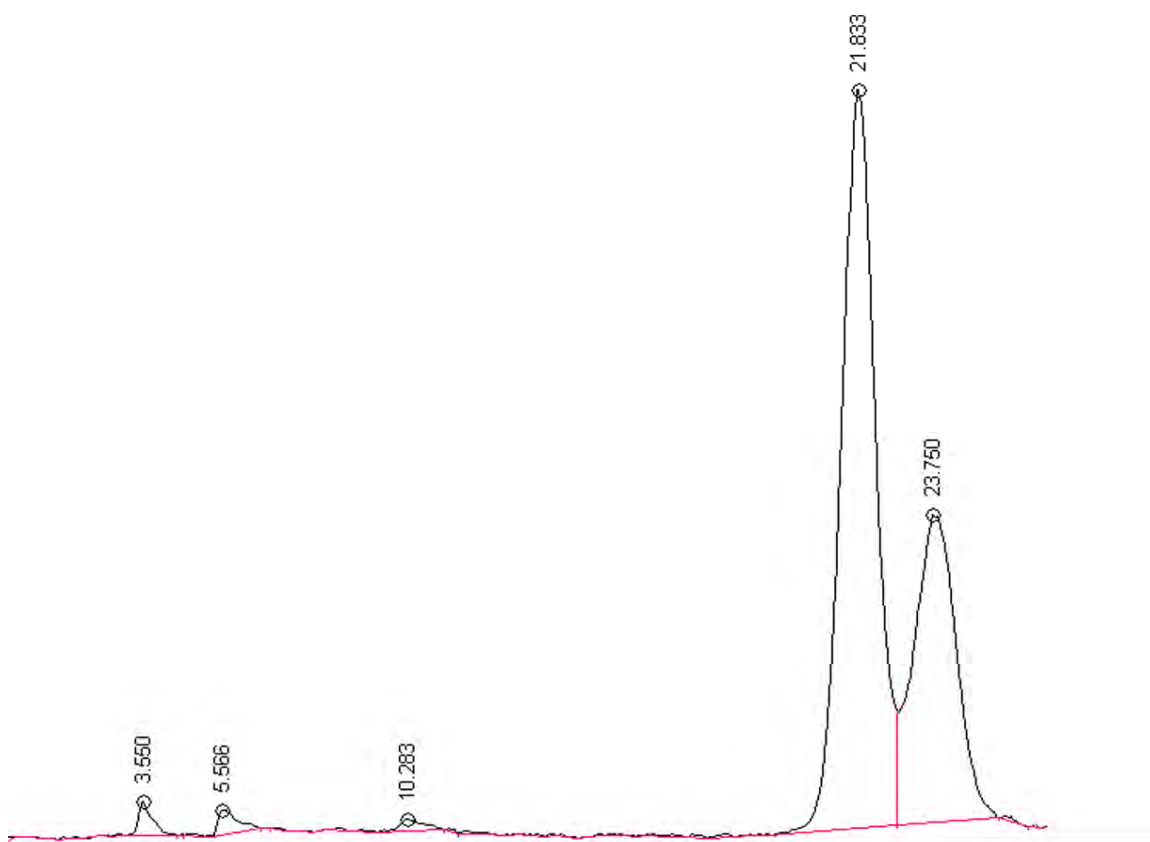
รูปที่ 4.22 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังจากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์CU-CH4 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโตนไนโตรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.23 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังจากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโตนไนโตรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.21 4.22 และ 4.23 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโทสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลแรมโนสเพียงเล็กน้อย ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ EPS-2 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบและเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี ซึ่งพบว่ามีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโทสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลแรมโนสเพียงเล็กน้อยเป็นองค์ประกอบ

จากรูปที่ 4.22 และ 4.23 พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่คือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโทส ทั้งนี้เวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์มีค่าใกล้เคียงกันมาก และมีพีคที่ซ้อนทับกัน จึงทำการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในช่วงเวลาการแยก (Gradient elution) เพื่อวิเคราะห์ชนิดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยใช้สารละลายอะซิโตไนโตรล์ (acetonitrile) ความเข้มข้นเริ่มต้น 90% โดยปริมาตรจนถึง 80% โดยปริมาตรในช่วงเวลา 30 นาทีเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตามวิธีในข้อ 3.3.3.1.2 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.24



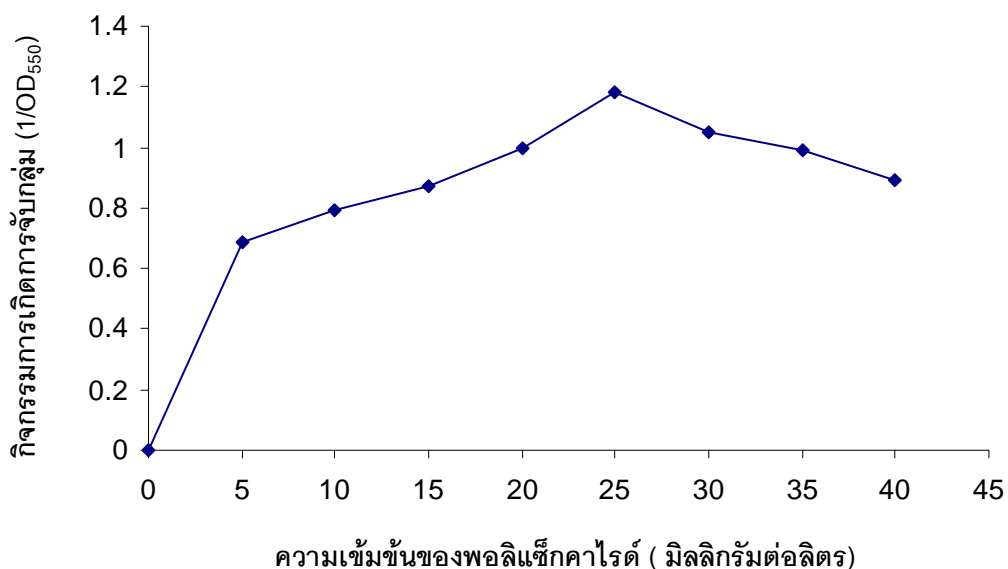
รูปที่ 4.24 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโตนไทรล์ความเข้มข้นเริ่มต้น 90% โดยปริมาตรจนถึง 80% โดยปริมาตรในช่วงเวลา 30 นาทีเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.24 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 40.28 % น้ำตาลกาแลคโทส 30.01 % และมีน้ำตาลแรมโนส 0.77% เป็นองค์ประกอบ

4.5.9 การศึกษาความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4

จากการนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มาวิเคราะห์ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.8 ซึ่งพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มี

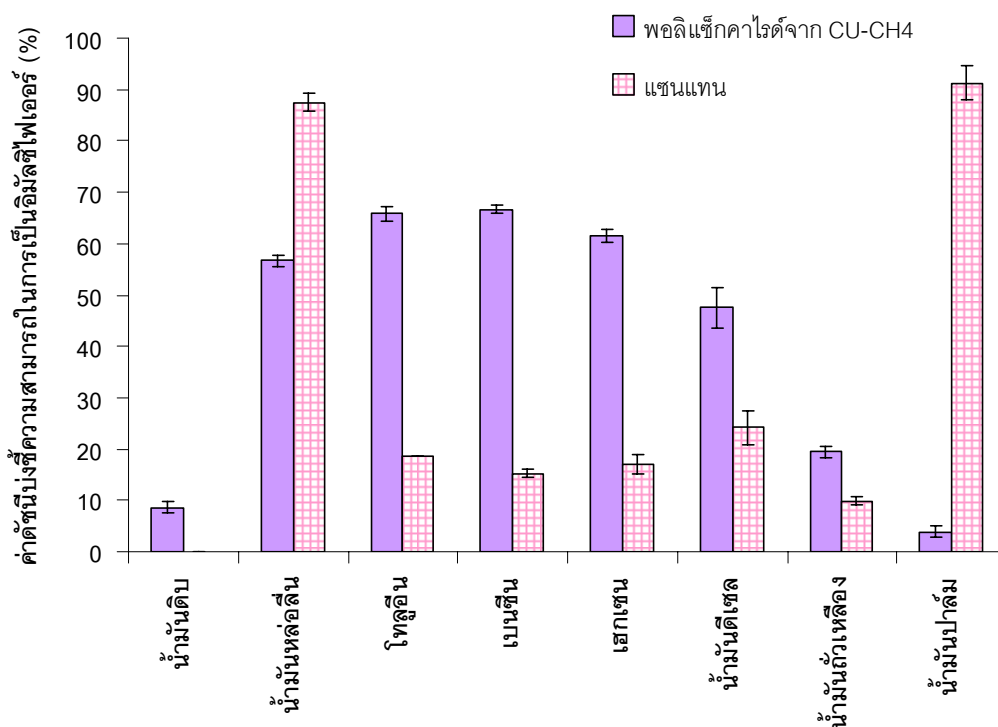
ความสามารถเป็นสารก่อการจับกลุ่ม โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสามารถสูงสุดในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับอนุภาคดินได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ความเข้มข้น 5 - 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.5.10 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 1:1 และวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ตามวิธีในข้อ 3.3.6.9 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

จากรูปที่ 4.26 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้ ซึ่งมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ กับ น้ำมันหล่อลื่น เบนซีน เฮกเซน โทลูอีน ได้ดี โดยพบว่ามีค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (E_{24}) มากกว่า 50% และมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ กับ น้ำมันดีเซล ได้ปานกลาง โดยพบว่ามีค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (E_{24}) เท่ากับ 47.56% และพบว่ามีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ กับ น้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม น้อยกว่า 20% และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 กับแซนแทน พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้แก่ น้ำมันดิบ โทลูอีน เบนซีน เฮกเซน น้ำมันดีเซล น้ำมันถั่วเหลือง ได้ดีกว่าแซนแทน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เป็นที่ทราบกันว่าด้วยสมบัติที่หลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ เพื่อตอบสนองของความต้องการสำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ตามความต้องการของอุตสาหกรรมต่าง ๆ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษา ชนิด ประสิทธิภาพ การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ อันได้แก่แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่เสริมด้วยซูโครสที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลที่ได้พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยที่สายพันธุ์ CU-CH4 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ 2.380 กรัมต่อลิตร จึงได้นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพต่อไป

จากการศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการย่อยด้วยกรดและนำมาวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 และ CU-M4 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น แรมโนส กาแลคโทส กลูโคส แมนโนส และไซโลส ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ของแมนโนส เช่นเดียวกับการรายงานของ Cerning และคณะ (1988) ที่พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Streptococcus thermophilus* สายพันธุ์ต่างๆ ประกอบไปด้วย น้ำตาลกาแลคโทส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส และแมนโนส แสดงถึงความหลากหลายของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์หรือที่เรียกว่าเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ในขณะที่งานวิจัยของ Manca และคณะ (1996) ที่พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 ที่ผลิตจาก *Bacillus thermoantarcticus* เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียว

จากการศึกษาสมบัติความเสถียรต่อความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์โดยการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมตริก (TGA) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายในช่วงระหว่าง 200-400 องศาเซลเซียส โดยพอลิ

แซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-M2 และ CU-M4 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย (decomposition stage) 3 ขั้นตอน พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-E3 CU-F6 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน และพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-M5 มีขั้นตอนกระบวนการสลายเพียง 1 ขั้นตอน โดยที่สมบัติที่ต่างกันเหล่านี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อรูปแบบการย่อยสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ Parikh และ Madamwar (2006) รายงานว่า กัวร์กัมและแซนแทนมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูง มีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายในช่วง 240-360 องศาเซลเซียส สำหรับกระบวนการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จะประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้ 1) การทำลายการดูดซับของน้ำกับพอลิแซ็กคาไรด์ 2) การกำจัดโมเลกุลของน้ำ 3) การย่อยสลายพอลิเมอร์ โดยการแตกพันธะ C-O และ C-C ในวงแหวนน้ำตาลเป็นผลให้เกิด CO, CO₂ และ H₂O 4) การเกิดโครงสร้างของ polynuclear aromatic และ graphitic carbon (Fried, 2000; Zamora และคณะ, 2002)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 CU-F6 CU-M2 CU-M4 และ CU-M5 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (%syneresis) ต่ำสุดที่ 18.72% แสดงว่ามีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงสุด ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการอุ้มน้ำของแซนแทน พบว่าแซนแทนสามารถอุ้มน้ำได้สูงกว่าประมาณ 3 เท่า โดยมีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 5.71% ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Tako และคณะ (1982) รายงานว่าแซนแทนมีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 5.5% โดยแสดงความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี และจากการวิเคราะห์ความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 มีสมบัติที่ดีคือสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้องและสารละลายมีลักษณะขุ่นหนืด ขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์อื่นๆ ถึงแม้จะละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้องแต่ไม่เกิดลักษณะขุ่นหนืด และต้องใช้อุณหภูมิสูงในการละลาย ทั้งนี้การที่พอลิเมอร์สามารถพองตัวและละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมดนั้นขึ้นอยู่กับการมีหมู่ไฮดรอกซิลในพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ (BeMiller และ Whistler, 1996) และเมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 มาศึกษาหาค่าความหนืด พบว่าค่าความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 และ CU-CH4 มีค่าเท่ากับ 17 และ 14.5 cps ตามลำดับ ซึ่งต่างกันเพียงเล็กน้อย

แต่ต่ำกว่าของแซนแทนมาก โดยแซนแทนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความหนืดสูง มีสมบัติการไหลที่ดี (Margaritis และ pace, 1985) แต่ในการหมักต้องใช้พลังงานมากเนื่องจากความหนืดที่สูงมากนี้เอง

การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1 CU-CH4 CU-E3 และ CU-F6 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันถั่วเหลือง โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงสุด และมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่าแซนแทน และเมื่อติดตามความเสถียรของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นระยะเวลา 14 วันพบว่า ความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงตามระยะเวลาต่างๆ ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ CU-CH4 ยังคงมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ CU-CH4 มีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น โดยมีการผลิตสูงถึง 2.380 กรัมต่อลิตร และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมในอุตสาหกรรมคือ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สามารถละลายน้ำและเกิดลักษณะขุ่นหนืด และมีความสามารถในการอุม้มน้ำได้ดีเมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มาทำการศึกษาต่อไป

รูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ในอาหารเหลวที่ตัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 เริ่มผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณของการเจริญ โดยการผลิตจัดเป็นแบบเมตาบอไลต์ปฐมภูมิที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ร่วมกับการเจริญ โดยมีปริมาณการผลิตสูงสุดที่ช่วงการเจริญคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน โดยศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยาหรือการทดสอบทางชีวเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 จัดเป็นแบคทีเรีย

ในสกุล *Klebsiella* และจาก phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ 342 อย่างไรก็ตามจากข้อมูลการศึกษาขั้นต้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าเชื้อนี้คือ *Klebsiella pneumoniae* จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 เป็นแบคทีเรียสกุล *Klebsiella* จึงเรียกแบคทีเรียนี้ว่า *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ทั้งนี้แบคทีเรียสกุล *Klebsiella* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง สามารถพบได้ในธรรมชาติ ได้แก่ น้ำ ดิน พืช และยังอาศัยอยู่ตามเยื่อเมือกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น คน ม้า หมู เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคน และอาจเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ได้ (Sahly และคณะ, 2000; Podschun และคณะ, 2001) *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ 342 เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช (endophytic) มีความสัมพันธ์ที่ดีกับพืชโดยสามารถตรึงไนโตรเจนในพืชได้ เช่น ข้าวโพด และข้าวสาลี ซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของโลก ซึ่งอาจทำให้ลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในพืช และอาการของโรคขาดแคลนไนโตรเจนในพืช และยังพบว่า *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ 342 มีแนวโน้มที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้จากการทดลองในหนูทดลอง แต่มีความรุนแรงน้อยกว่าสายพันธุ์อื่นๆที่แยกได้จากผู้ป่วย (Iniguez และคณะ, 2004; Fouts และคณะ, 2008) สำหรับการผลิตและการใช้ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียนี้ มีรายงานว่า *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ K32 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล แรมโนส กาแลคโทส แมนโนส (Bryan และคณะ, 1986) *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ S11 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 0.973 กรัมต่อลิตร เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ (Dermlim และคณะ, 1999) *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ H12 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กลูโคส กาแลคโทส และแมนโนส (Kobayashi และคณะ, 2002) *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ K63 ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความข้นหนืด และพอลิแซ็กคาไรด์มีน้ำตาลกาแลคโทส ฟูโคส และกรดกาแลคทูโรนิก เป็นองค์ประกอบ และมีสมบัติเป็นซูโดพลาสติก จึงมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ (Ramirez-Castillo และ UribeArrea, 2004)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 87.5% และ 2.8% ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์พบว่า มีประจุสุทธิเป็นลบ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Dermlim และคณะ (1999) พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ S11 เป็นเฮเทอโรพอลิ

แซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ การที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบเนื่องจากอาจมีหมู่ acidic เช่น ไพรูเวต ซัคซิเนต กรดยูโรนิก อะซิเทต หรือซัลเฟต อยู่บนโมเลกุล (Sutherland, 1977; Pace 1980) ซึ่งเป็นผลให้เกิดปฏิกิริยากับ Quaternary ammonium ion (QN⁺) ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride) และทำให้เกิดตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์กับเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ขึ้น (Scott, 1965)

การทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี พบพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 เป็นลำดับส่วนหลัก และเมื่อนำ EPS-2 มาศึกษามวลโมเลกุลโดยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี พบว่ามีมวลโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน จากงานวิจัยของ Dermlim และคณะ (1999) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ S11 มีมวลโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน และผลจากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR spectroscopy) ยืนยันว่า EPS-2 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแสดงหมู่ฟังก์ชันนัล O-H C-H และพันธะ C-O ที่อยู่ในโครงสร้างวงแหวนของน้ำตาลของพอลิแซ็กคาไรด์ จากการพิจารณาโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์โดย ¹H-NMR สเปกโทรสโกปี พบว่ามีสัญญาณของ anomeric proton non-anomeric proton และการเชื่อมต่อกันแบบ β -D-configuration ของน้ำตาล โดยพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มีน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ และมีน้ำตาลแรมโนส เป็นองค์ประกอบเล็กน้อย

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* sp.สายพันธุ์ CU-CH4 มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม โดยพบว่ามีความสามารถสูงที่สุดในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับอนุภาคดินได้ดีที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความสามารถลดลงที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการกระจายตัวที่ไม่สมบูรณ์ของสารก่อการจับกลุ่ม ทำให้อนุภาคดินที่อยู่รอบๆ สารก่อการจับกลุ่มเท่านั้นที่เกิดการจับกลุ่มกัน ดังนั้นอนุภาคดินอื่นๆจะไม่เกิดการจับกลุ่ม (Yokoi และคณะ, 1997) และเมื่อมีปริมาณสารก่อการจับกลุ่มที่มากเกินไปจะเกิดการจับเกาะบนผิวของอนุภาคดินที่มากเกินไปส่งผลให้แรงดึงดูดของอนุภาคอื่น ๆ ลดลง และความสามารถในการจับกลุ่มลดลงด้วย (Kwon และคณะ, 1996) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ของ *Klebsiella* sp.สายพันธุ์ CU-CH4 ยังมีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้ ซึ่งมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับ น้ำมันหล่อลื่น เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ได้ดี

โดยมีค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอีมีลซิไฟเออร์ (E_{24}) มากกว่า 50% โดย Willumsen และ Karlson (1997) กล่าวว่า หลักการการพิจารณาความสามารถของการเป็นอีมีลซิไฟเออร์ที่ดีคืออีมีลซิไฟเออร์ต้องมีค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอีมีลซิไฟเออร์ (E_{24}) น้อยที่สุดเท่ากับ 50% นอกจากนี้พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4 ยังมีความสามารถในการเป็นอีมีลซิไฟเออร์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดีกว่าแซนแทน ซึ่งจากสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ศึกษามาอาจเป็นทางเลือกสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านการบำบัดน้ำเสีย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถดูดซับโลหะหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ สำหรับการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ด้านการบำบัดน้ำเสีย
2. ควรศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อความสามารถในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น ชนิดและความเข้มข้นของไอออนบวก ค่าความเป็นกรด-เบส เป็นต้น เพื่อเพิ่มความสามารถในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์. 2550. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และศึกษาสมบัติเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พลอยพัฒน์ นียมพลอย. 2551. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเหง้าของว่านคันทมาลา *Curcuma aromatica* Salisb. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิมลสิน ศิริพัฒนานนท์. 2549. การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* 473 เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์. 2551. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Anonymous. 1996. Bioproducts: bio-concrete. BioIndustry 13 : 56-57.
- Ausubel, F.M., and others. 1999. Current Protocol In Molecular Biology. New York : John Wiley and Sons.
- Baird, J. K. 1989. Xanthan. Encyclopedia of Polymer Science Engineering 17 : 901-918.
- BeMiller, J. N. and Whistler, R. L. 1996. Carbohydrate. In Fennema, O. R. (ed.), Food Chemistry, 3rd, pp. 157-223. 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., Oberg, C.J., Welker, D.J. 2001. Use of exopolysaccharide - producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. International Dairy Journal 11 : 433-439.

- Bromfield, S. M. 1954. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. General Microbiology 11 : 1-6.
- Brown, R. M. Microbial cellulose : A new resource for wood, paper, textiles, food, and specialty products [online]. 2002. Available from : <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html>. [2009, February 20]
- Bryan, B.A., Linhardt, R.J. and Daniels, L. 1986. Variation in Composition and Yield of Exopolysaccharides Produced by *Klebsiella* sp. Strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Applied and environmental Microbiology 51 : 1304-1308.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. United States of America : Waverly press.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Dermazeaud, M. J. and Landon, M. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnology Letter 10 : 255-260.
- 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.
- Clark, J. High Performance Liquid Chromatography-HPLC [online]. 2007. Available from : <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>. [2010, March 23]
- Compere, A.L. and Griffith, W.L. 1978. Production of high viscosity glucans from hydrolyzed cellulose. Developments in Industrial Microbiology 19 : 601-607.
- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. 1987. Surface active agents of two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology 53 : 224-229.
- Dawes, E. A., Ribbons, D. W. and Large, P. J. 1966. The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. Biochemical Journal 98 : 795-803.
- Dawkins, J.V. 1982. Gel Permeation Chromatography. In Simpson, C.F. (ed.), Techniques in Liquid Chromatography, pp. 337-338. London : Wiley Heyden.

- Dearfield, K. L. and Abermathy, C. O. 1988. Acrylamide: its metabolism developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research* 195 : 45-77.
- Deavin, L., Jarman, T. R., Lawson, C. J., Righelato, R. C. and Slocombe, S. 1977. The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. In Extracellular Microbial Polysaccharides. Washington : American Chemical Society.
- De Belder, A. N. 2003. Handbook from Amersham Biosciences, Sweden : Amersham Biosciences AB.
- 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.
- Duboc, P. and Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11 : 759-768.
- 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.
- Faijes, M. and Planas, A. 2007. In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. *Carbohydrate Research* 342 : 1581–1594
- 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.
- Fao. Section B: Specifications of certain food additives (uses other than as flavouring agents) and other substances [online]. 2005. Available from : <http://www.fao.org/docrep/008/a0044e/a0044e05.htm> [2010, March 19]
- Field, L.D. and Sternhell, S. 1989. Analytical NMR. Avon : Bath press.

- 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.
- 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.
- Fouts, D.E., and others. 2008. Complete Genome Sequence of the N₂-Fixing Broad Host Range Endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and Virulence Predictions Verified in Mice. PLoS Genetics 4 : 1-18.
- Freitas, F., and others. 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. Bioresource Technology 100 : 859-865.
- Friebolin, H. 2005. Basic One- and Two-Dimensional NMR spectroscopy, 4th ed. Weinheim : Wiley-VCH.
- Fritz, J.S. and Gjerde, D.T. 2000. Ion Chromatography, 3rd ed. Germany : Wiley-VCH.
- Gao, H. and Gu, W.Y. 2007. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. Biochemical Engineering Journal 33 : 202-210.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A. and Gomez, E. 2000. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. Biotechnology Advances 18 : 549-579.
- Glicksman, M. 1979. Gelling hydrocolloids in food product applications. In Blanshard, J. M. V. and Mitchell, J. R. (ed.), Polysaccharides in food, pp. 185-204. London : Butterworths.
- Gooch, J.W. 1997. Analysis and Deformulation of Polymeric Materials : paints, plastics, adhesives, and inks. New York : Plenum Press.
- Hamley. Introduction to Gel Filtration [online]. 2004. Available from : <http://slohs.slcsud.org/pages/teachers/rhamley/index.htm> [2010, March 23]

- Harada, T. 1977. Production, properties, and application of curdlan. In Sandford, P.A. and Laskin, A. (ed.), Extracellular microbial polysaccharides, pp. 265-283. Washington, D.C. : American Chemical Society.
- 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.
- Hou, C. T., Laskin, A. I. and Patel, R. N. 1978. Growth and Polysaccharide Production by *Methylocystis parvus* OBBP on Methanol. Applied and Environmental Microbiology 37 : 800-804
- Hsu, D.D. Definition of Infrared absorption spectrometers [online]. 1996. Available from : [http://www.chemicool.com/definition/infrared absorption spectrometers.html](http://www.chemicool.com/definition/infrared%20absorption%20spectrometers.html) [2010, March 23]
- Iniguez, A.L., Dong, Y. and Triplett, E.W. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. The American Phytopathological Society. 17 : 1078-1085.
- 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.
- Jansson, R. E., Lindberg, B. and Sandford, P. I. A. 1983. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. Carbohydrate Research 124 : 135-223.
- Jeanes, A. W., and others. 1954. Characterisation and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. Journal of the American Chemical Society 76 : 5041-5052.
- Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Kyriakides, M.L., Kyriakidis, D.A. and Skaracis, G.N. 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. Process biochemistry 39 : 249- 256.

- 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., Veeder, G.T. and Richey, D.D. 1977. Zanflo-A novel bacterial heteropolysaccharide. ACS Symposium Series 45 : 220-230.
- Kim, D., Thomas, S. and Fogler, H. S. 2000. Effect of pH and trace minerals of long-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. Applied Environmental Microbiology 66 : 976-981.
- Kimura, M. 1980. A Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide Sequences. Journal of Molecular Evolution 16 :111-120.
- Kobayashi, T., Takiguchi, Y., Yazawa, Y., Nakata K., Yamaguchi, T. and Kurane, R. 2002. Structural analysis of an extracellular polysaccharide bioflocculant of *Klebsiella pneumoniae*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66 : 1524-1530.
- 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.
- Kojima, I., Saito, T., Iizuka, M., Minamiura, N. and Ono, S. 1993. Characterization of levan produced by *Serratia* sp. Journal of Fermentation and Bioengineering 75 : 9-12.
- Konicek, J., Lasik, J. and Wurst, M. 1977. Production and characteristics of the exocellular polysaccharide in mutant strains of *Xanthomonas fuscans*. Folia Microbiol (Praha) 22 : 12-8.
- Kraak, J.C. 1982. Ion-exchange and Ion-pair Chromatography. In Simpson, C.F. (ed.), Techniques in Liquid Chromatography, pp. 303-309. London : Wiley Heyden.

- Kumar, C.G., Joo, H.S., Choi, J.W., Koo, Y.M., Chang, C.S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilus *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., Oh, H.M. and Yoon, B.D. 1996. A novel flocculant biopolymer produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. Biotechnology Letters 18 : 459-464.
- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnology Advances 19 : 597-625.
- Lehninger, A. L. 1975. Biochemistry, 2nd. New York : Worth.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. 1993. Chapter11. In Principle of Biochemistry, 2nd. New York : Worth.
- 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.

- 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.
- 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.
- Ludwig, W., and others. 1995. Comparative sequence analysis of 23S rRNA from proteobacteria. Systematic and Applied Microbiology 18 : 164-188.
- Luo, X., Liang, X. and You, T. 2009. Direct Submission. Life Science Department of Heilongjiang. Microbiology Lab.
- Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 1996. Chemical Composition of Two Exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. Applied and Environmental Microbiology 62 : 3265-3269.
- 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 Moo Young, M. (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.
- Mata, J.A., Bejar, V., 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.
- Matsukawa, S. and Watanabe, T. 2007. Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low- and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurements. Food Hydrocolloids 21 : 1355-1361.

- Meunchang, S., Ando, S. and Yokoyama, T. 2003. Direct Submission. Soil Microbiology Research Group.
- Misaki, A., Tsumuraya, Y., Kakuta, M., Takemoto, H. and Igarashi, T. 1979. D-Allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas* sp. Carbohydrate Research 75 : C8-C10.
- 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.
- 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.
- Novak, J.S., Tanenbaum, S.W. and NaKas, J.P. 1992. Heteropolysaccharide Formation by *Arthrobacter viscosus* Grown on Xylose and Xylose Oligosaccharides. Applied and Environmental Microbiology 58 : 3501-3507.
- Ono, K., Kawahara, Y. and Ueda, S. 1977. Effect of pH on the content of glycolipids in *Aureobasidium pullulans* S-1. Agricultural Biology and Chemistry 41 : 2313-2317.
- Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R. and Cosar, T. 2003. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. Bioresource Technology 90 : 71-74.
- Pace, G.W. 1980. Production of extracellular microbial polysaccharide. In Fiechter, A. (ed.), Advances in biochemical engineering, pp 41-66. Berlin Heidelberg New York : Springer.
- Parikh, A. and Madamwar, D. 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. Bioresource Technology 97 : 1822-1827.

- 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.
- Paul, A.S. 1979. A survey of possible new polysaccharides, London : Butterworth.
- Paul, F., Morin, A. and Monsan, P. 1986. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. Biotechnology Advances 4 : 245-259.
- Pinto-Tomas, A.A., and others. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutterants. Science 326 : 1120-1123.
- Podschun, R., Pietsch, S., Holler, C. and Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Applied and Environmental Microbiology 67 : 3325-3327.
- 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.
- Qader, S. A. U., Iqbal, L., Aman, A., Shireen, E. and Azhar, A. 2005. Production of Dextran by Newly Isolated Strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. Turkish Journal of Biochemistry 31 : 21-26.
- Ramirez-Castillo, M.L. and Uribebarrea, J.L. 2004. Improved process for exopolysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* by a fed-batch strategy. Biotechnology Letters 26 : 1301-1306.
- Renaud, M., Belgacem, M.N. and Rinaudo, M. 2005. Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions. Polymer 46 : 12348-12358.
- Reusch, W. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy [online]. 2007. Available from : <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/spectro.htm> [2010, March 23]
- Ribbons, D. W. and Evans, W. C. 1962. Oxidative metabolism of protocatechuic acid by certain soil pseudomonads: a new ring-fission mechanism. Biochemical Journal 83 : 482-92.

- Rinaudo, M. and Milas, M. 1978. Polyelectrolyte behaviour of a bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: comparison with carboxymethylcellulose. Biopolymers 17 : 2663-2678.
- Robyt, J. F. 1986. Encyclopedia of Polymer Sciences and Technology. New York, U.S.A.
- Sahly, H., Podschun, R. and Ullmann, U. 2000. *Klebsilla* infections in the immunocompromised host. In Keisari, Y. and Ofek, I. (ed.), The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms, pp. 237-249. Kluwer Academic : Plenum.
- Salehizadeh, H. and Shojaosadati, S. A. 2001. Extracellular 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 from *Bacillus firmus*. Water Research 37 : 4231-4235.
- Samaddar, N., and others. 2009. Direct Submission. Life Science and Biotechnology.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning : a laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory : Cold Spring Harbor.
- Sanford, P.A. and Baird, J.K. 1983. Industrial utilization of polysaccharide, In Aspinall, G.O, (ed.), The polysaccharides, pp. 411-490. New York : Academic Press.
- Santos, M., Rodrigues, A. and Teixeira, J.A. 2005. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512. Biochemical Engineering Journal 25 : 1-6.
- Scott, J.E. 1965. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In Whistler, R.L. (ed.), Methods of carbohydrate chemistry, pp. 38-44. New York : Academic Press.
- Seo, H.P., and others. 2004. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. Bioresource Technology 95 : 293-299

- Skoog, D.A., West, D.M. and Holler F.J. 1988. Analytical Chemistry, 5th ed. The United States of America : Saunders College.
- Smith, B.C. 1996. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. United States of America : CRC Press.
- Smitinont, T., and others. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. International Journal of Food Microbiology 51 : 105-111.
- Stauffer, K. R. and Leeder., J. G. 1978. Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey. Journal Food Science 43 : 756-758.
- 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.
- Survase, S.A., Saudagar, P.S. and Singhal ,R.S. 2007. Use of complex media for the production of scleroglucan by *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156. Bioresource Technology 98 : 1509-1512.
- Sutherland, I.W. 1977. Bacterial exopolysaccharides-their nature and production. In Sutherland, I.W. (ed.), Surface carbohydrates of the prokaryotic cell, pp. 27-95. London : Academic Press.
- Sutherland, I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharide, New York : Cambridge University Press.
- Sutherland, I.W. 2001. Microbial polysaccharides from Gram -negative bacteria. International Dairy Journal 11 : 663-674
- 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.

- 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.
- Toeda, K. and Kurane, R. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT 201. Agricultural and Biological Chemistry 55 : 2793-2799.
- 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.
- 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.
- 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.
- Xia, R., Zhang, Y. and Xu, H. 2009. Direct Submission. State Key Laboratory of Microbial Technology.
- Yamamoto, F. and Cunha, R.L. 2007. Acid gelation of gellan: Effect of final pH and heat treatment conditions. Carbohydrate Polymers 68 : 517-527.
- Yang, L. and Zhang, L.M. 2009. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. Carbohydrate Polymers 76 : 349-361.

- Ying, C., Liping, S., Yong, Z., Lei, W. and Ligu, 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., Watanabe, T. and Fuji, Y. 1990. Isolation and Characterization of Polysaccharide-Producing Bacteria from Kefir Grains. Journal of Dairy Science 73 : 1684-1689.
- 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.
- Yun, U.J. and Park, H.D. 2003. Physical properties of an extracellular polysaccharide produced by *Bacillus* sp. CP912. Letters in Applied Microbiology 36 : 282-287.
- Zamora, A. Carbohydrates - Chemical Structure [online]. 2005. Available from : <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>. [2010, March 19]
- 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
สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที		

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

ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	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
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.0	
อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที		

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม

น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC

สารละลาย A

ทริปโตน (Tryptone)	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.46	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl)	2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย B

กลูโคส (Glucose)	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมกับน้ำปลอดประจุ จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรอง ขนาด 0.20 ไมโครเมตร ผสมสารละลาย A และ B ทั้งหมดด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
--------------------------------------	----	-----------

EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร
-------------------------------------	-----	-----------

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า

Tris base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	242	กรัม
---	-----	------

EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	100	มิลลิลิตร
-------------------------------------	-----	-----------

กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
-------------------	------	-----------

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตรปริมาตร 800 มิลลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุตลอดเพื่อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)	60	มิลลิกรัม
---------------------	----	-----------

บัฟเฟอร์ TE	1	มิลลิลิตร
-------------	---	-----------

4. 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium lauryl sulfate	10	กรัม
-----------------------	----	------

ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 29.2 กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลาย CTAB/NaCl (Hexadecyl trimethyl ammoniumbromide/sodium chloride)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 4.1 กรัม

CTAB 10 กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °ซ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7. คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 :1 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

8. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °ซ จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้หลาย ๆ ครั้งด้วย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรดเบสของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม β -mercaptoethanol เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่

อุณหภูมิ 4 °C ผสมฟินอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25:25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

9. เอทานอล 70%

เอทานอล 99%	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

10. อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8%

อะกาโรสเจล	0.8	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร
หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน		

11. อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 %

อะกาโรสเจล	2	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร
หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน		

12. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap)

แอมพิซิลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร
กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร		

13. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) เข้มข้น 2%

X-gal	20	มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (DMF)	1	มิลลิลิตร
กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร		

14. isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 โมลาร์

IPTG	238	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมครอนเมตร

15. สารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ฟีนอล	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

16. สารละลาย Coomassie blue

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

17. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล

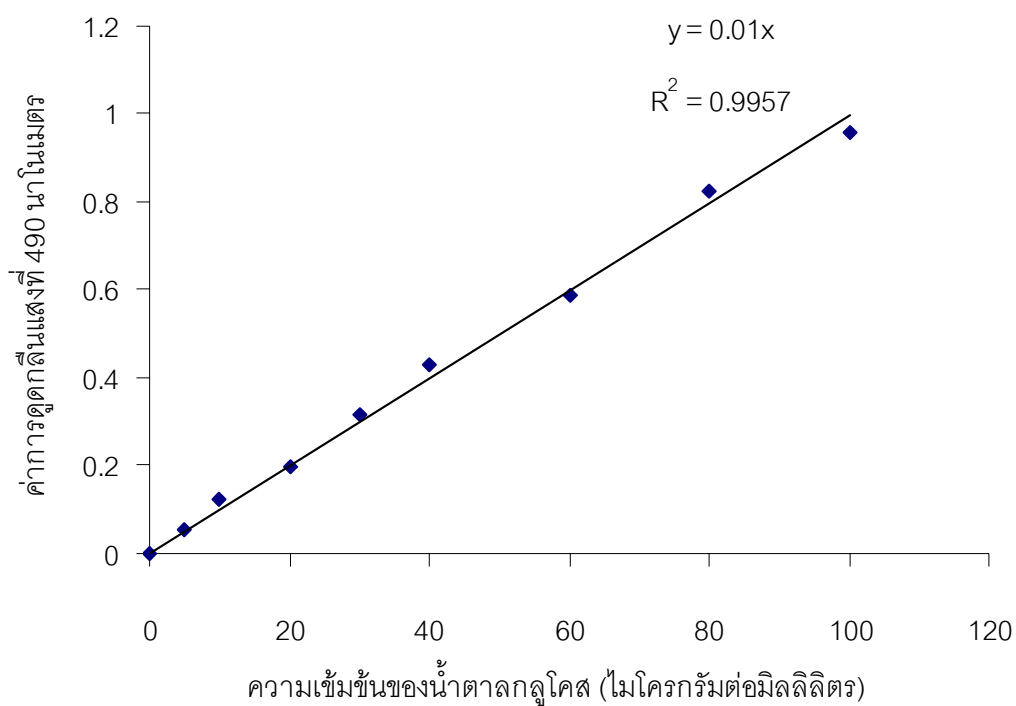
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.004	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

18. สารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

Cetylpyridinium Chloride (CPC)	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

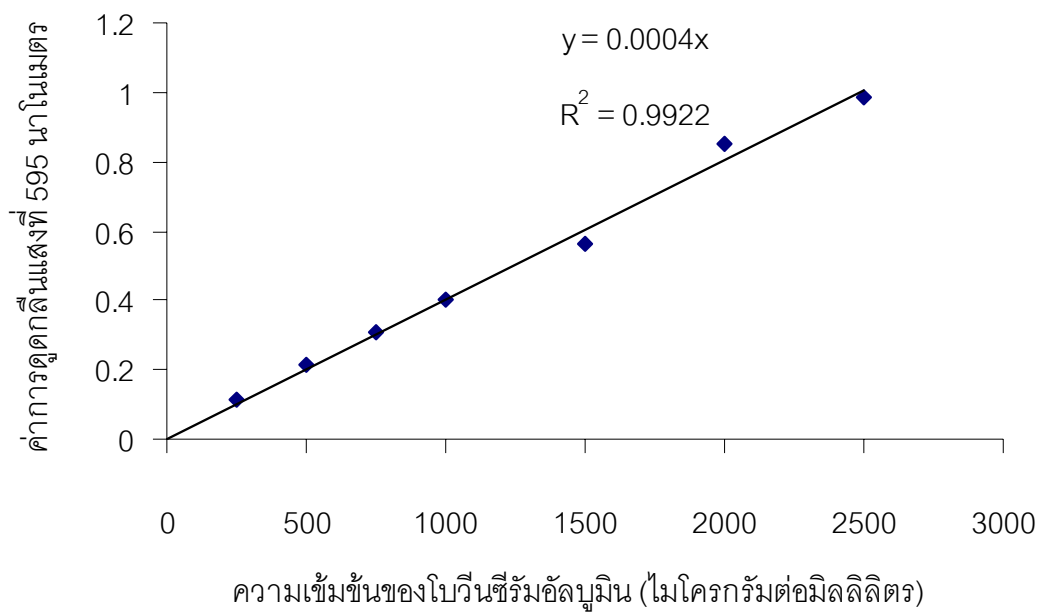
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

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 กับโปรตีนมาตรฐาน โบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ง
ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ CU-CH4

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATG
CAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTT
CGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTG
AGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT
TGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTT
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACT
GCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGC
GACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTG
GAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATC
AGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGG
CGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAC
CGTA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธิดารัตน์ วงศ์รัตน์ เกิดวันที่ 11 มิถุนายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ที่อยู่ปัจจุบัน 597/130 หมู่บ้านอยู่เจริญ ซอยอินทามระ 41 ถนนสุขุมวิท เขตดินแดง กรุงเทพฯ 10320

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “ TSB 2009 : Biotechnology : A Solution to the Global Economic Crisis? ” ระหว่างวันที่ 24-25 กันยายน 2552 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ ในหัวข้อเรื่อง “ Polymer production from bacteria with chemical and physical properties thereof ”