รายงานวิจัย

การผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Production of Microbial Polymer for the Application in Food Industry

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน

รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร

อาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการใช้สารเติมแต่งในอาหารมากมาย รวมถึงการใช้พอลิเมอร์ในหลากหลายวัตถุประสงค์ ทั้งเพื่อช่วยเพิ่มความหนืด ความคงตัวให้กับอาหาร หรือเพื่อคุณลักษณะจำเพาะบางประการ พอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถผลิตได้ทั้งจากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ โดยจุลินทรีย์เป็นแหล่งหนึ่งที่สำคัญ เพราะให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีสมบัติเฉพาะตัวที่ดี ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ อีกทั้งการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ยังไม่ต้องคำนึงถึงสภาพภูมิอากาศ

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างอ้อย ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 อุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในการผลิตพอลิแซ็กตาไรด์ 40 องศาเซลเซียส พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว ต่อมาได้ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำ พบว่าสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย ซูโครส 30 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 9 กรัม และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัม เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 นี้ เป็น *Enterobacter cloacae* เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความสามารถจำกัดในการให้ผลผลิต การก่อให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตจึงถูกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เป็นแบคทีเรียที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ EN02 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ทำให้ได้พอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้นถึง 12 เท่า เมื่อศึกษาในระดับถังหมัก พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีความสามารถในการผลิต เท่ากับ 0.3305 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ พบว่าเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลกาแลคโทส และไซโลสเพียงเล็กน้อย มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้องและมีความหนืดสูง นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง เป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันถั่วเหลืองสูงสุด และมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 2.380 กรัมต่อลิตร จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยาหรือการทดสอบทางชีวเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* แต่

เนื่องจากทั้ง *E. cloacae* และ *Klebsiella* ยังไม่เป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมอาหาร ผู้วิจัยจึงได้คัดแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองเพิ่มเติม

แลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ได้รับการคัดแยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดอง โดยมีลักษณะสมบัติที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติเหมือนกันกับแบคทีเรีย *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) จึงเรียกแบคทีเรียนี้ว่า *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นฮอมอพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส โดยมีผลผลิตสูงสุด 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ หลังเข้าสู่ภาวะคงที่ แต่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ยังไม่มีสมบัติที่โดดเด่น จึงได้คัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักเพิ่มเติมอีก จนพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากหน่อไม้ดองทั้งหมด 8 สายพันธุ์ คือ L01 L02 L03 L04 L05 L06 L07 และ L08 โดยสายพันธุ์ L06 และ L07 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เท่ากับ 11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ องค์ประกอบน้ำตาลเชิงเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจัดว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด มีความสามารถในการก่ออิมัลชันได้ดี และแลคติกแอสิดแบคทีเรียยังจัดอยู่ในกลุ่ม GRAS ซึ่งเป็นที่ยอมรับและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย

ในการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรียที่สร้างพอลิเมอร์ในจำนวนมาก หลังจากการคัดเลือกได้แบคทีเรียจำนวนหนึ่งที่ให้ผลผลิตสูง พอลิเมอร์ที่ได้ทั้งหมดนี้ได้รับการศึกษาโครงสร้างทางเคมีและสมบัติทางกายภาพที่จะใช้เป็นตัวบ่งบอกการใช้งาน ได้ทำการหาสูตรอาหารที่ใช้สารราคาถูกลงเพื่อใช้แทนสูตรที่มีรายงานไว้ในบทความซึ่งมีราคาแพง สามารถทราบพารามิเตอร์ในการขยายส่วนการผลิตของแบคทีเรีย จากเชื้อทั้งหมดที่แยกได้มีจำนวนหนึ่งที่ให้ผลผลิตสูงและมีสมบัติที่น่าสนใจแต่ไม่สามารถนำมาใช้ในอาหารได้เนื่องจากผลการศึกษาทางอนุกรมวิธานได้จัดเชื้อเหล่านั้นเป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์และเชื้อเหล่านั้นสามารถประยุกต์ใช้กับงานอื่นได้เช่น การเกษตร สิ่งแวดล้อม เป็นต้น ขณะเดียวกันได้แยกพอลิเมอร์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยสามารถใช้ในอาหารได้ สมบัติต่างๆ ของพอลิเมอร์เหล่านี้จะเป็นเครื่องบ่งบอกการประยุกต์ในการใช้งานต่างๆ ได้โดยขึ้นกับลักษณะงานว่าตรงกับสารที่มีลักษณะที่เหมาะสม

Abstract

At present numerous food additives have found their use in Food Industry, this includes the use of polymer in different purposes. These include enhancing the viscosity, stability as well as specific purposes. Polysaccharide is one of the preferred polymers employed in food industry. It could be obtained from nature or by biosynthesis. Microbe is an important source for such polymer owing to the diversity of polymers produced, wide range of characteristic that suit for the specific purposes, good temperature stability and plausible to regulate.

The present study isolated bacteria from sugar cane, one of them was strain EN02 which gave highest yield of 8.57 mg/ml supernate upon cultured in 4% sucrose, pH of 6.5 at 30°C while production temperature was 40°C by which polysaccharide obtained consist solely of xylose. The optimum media compositions are sucrose 30 g, ammonium chloride 0.6g, magnesium sulfate 0.2 g, and 3g of dipotassium hydrogen phosphate. The classification of strain EN02 was conducted via sequence analysis of the 16S rDNA, the result of which identified this organism as *Enterobacter cloacae*. Mutagenesis aiming to increase yield was carried out by UV exposure of strain EN02 and gave rise of strain UV1-9 with 12 folds increase in polysaccharide produced. Further cultivation in a 5 liter fermentor, a yield of 0.33 g l^{-1} hr^{-1} was obtained. Chemical and physical characteristics of the polysaccharide indicated a heteropolymer consists of galactose and xylose. This polymer is rather stable at room temperature, soluble in water at room temperature and high viscosity in nature. In addition to strain EN02, strain CU-CH4 was also obtained with high water holding capacity and capable of emulsifying soy bean oil. Strain CU-CH4 was able to produce polysaccharide of 2.38 g l^{-1} of polymer. Further characterization of the 16S rDNA as well as biochemical characterization identified strain CU-CH4 as bacterium belongs to the genus *Klebsiella*. Despite good yield and good characteristics both *Klebsiella* and *Enterobacter* are not accepted in Food industry due to their possible pathogenicities to which the same also extend to their products. Although these polymers are not accepted in Food industry, they may found their application in other areas such as in environment aspect whose application does not affect human concern.

Lactic acid bacteria is well accepted as safe organism (GRAS) for use in Food were further isolated and characterized for polymer formed. Among LAB isolated, strain LAB1 which afterward characterized as *Weissella confusa* (*Lactobacillus confuses*) produced polymer as homopolymer of glucose with 13.78 mg ml^{-1} in yield. Further isolation yield 8 strains of lactic acid bacteria from sour bamboo shoot designated as L01-L08, among these strains L06 and L07 were able to produce polymer at 11.2 and 11.4 g l^{-1}, respectively. All 8 strains were found to produce homopolymer of glucose all of which possessed emulsifying activity. With their GRAS in nature, these polymers may prove valuable of their application in Food industry.

In the present work we were able to screen numerous bacteria that capable of producing polymer, among these those with high yield were isolated. The polymers produced were characterized chemically as well as physically, the results of which will be used to determine their application. Cultivation medium was formulated with low cost substances, the new formula was used in place of that was reported in literature with lower cost. Parameters for scaling up the system were also reported. From bacteria isolated, a number of them gave high yield with interesting characteristics unfortunately after taxonomic studies these organisms were classified as pathogenic bacteria. Despite of this, these organisms may found their use in other area such as in agriculture or environmental aspect. Meanwhile, we were able to isolate lactic acid bacteria that are able to produce polymer, this group of organism was regard as safe for use in food. The variable properties of polymers dictate their usage in work that require that particular property thus these polymers could be applied to different works that require that certain properties.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2550

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญเรื่อง	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วิธีดำเนินการวิจัย	13
3. ผลการวิจัย	30
4. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	88
รายการอ้างอิง	90
ภาคผนวก	93
ประวัตินักวิจัยและคณะ	95
สรุปผลงานตั้งแต่ปี 2550-2554 (ปีที่ 1-4)	96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน	32
2	ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อมีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน	34
3	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200	40
4	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (AY) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200	46
5	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y)	51
6	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm	56
7	แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราความเร็วในการกวนของใบพัดที่ 200 400 และ 600 rpm	61
8	ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9	64

9	แสดงอุณหภูมิการย่อยสลายที่จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9	66
10	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9	69
11	ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5%ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9	70
12	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช ในอัตราส่วน 1:1	71
13	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9	76
14	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9	76
15	ค่าความหนืดของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก	77
16	ลักษณะโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่คัดแยกได้จากหน่อไม้ดองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	78
17	เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซกคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ	80
18	แสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 หลังจากย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลาย 80% โดยปริมาตรอะซิโตรไทร์ลเป็นตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	81
19	แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ	84
20	ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง	85
21	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์	86

L01-L08 ตามลำดับ

22 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กับน้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 87

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และค่าความเป็นกรดด่าง ของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9	31
2	ความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน	33
3	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	34
4	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200	35
5	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	36
6	เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200	37
7	เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	37
8	เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	38
9	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5	41

	และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	
10	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y	41
11	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	42
12	เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200	43
13	เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	44
14	เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Yเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	45
15	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5	47

	และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	
16	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	48
17	เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	49
18	เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	50
19	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	53
20	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง	54
21	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	54

22	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง	55
23	เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	55
24	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	58
25	เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง เชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	59
26	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	59
27	เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง	60
28	เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	60
29	การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm และอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm	63
30	โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมักด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	64

31	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (ไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	65
32	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน	67
33	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมักโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน	68
34	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ	71
35	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ	72
36	ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร	73
37	ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร	74
38	ลักษณะตะกอนสีขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ภายหลังการเติมสารละลาย Cetylpyridiniumchloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล	75
39	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อ	79

ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเศลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

40 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 80
ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนัก
ต่อปริมาตร บ่มที่ 30 องศา เป็นเวลา 24 ชม.

41 โครมาโทแกรมแสดง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ข) ชนิด 82
น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้
จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L06 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้
สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็น
สารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันมีการเติมสารปรุงแต่งลงไปเพิ่มเติมจากตัววัตถุดิบเอง สารเหล่านี้สามารถเพิ่มคุณค่าของอาหารขึ้น และ/หรือถนอมอาหารได้ ด้วยสารเหล่านี้ทำให้สามารถพัฒนาอาหารในรูปแบบใหม่จากรูปแบบตามธรรมชาติซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบเดิมได้ จากแนวคิดของการเป็นครัวโลกของประเทศ ประเทศไทยจำเป็นต้องพัฒนาตนเองให้มีขีดความสามารถในการแข่งขันกับประเทศอื่น และสามารถให้ผลิตภัณฑ์ที่ประเทศคู่ค้าต้องการ การส่งออกเพียงวัตถุดิบแม้จะเกิดเป็นอย่างมาก แต่ราคาของอาหารที่เพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากการแปรรูปและพัฒนาอาหารในรูปแบบใหม่มากกว่า ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีอุตสาหกรรมประเภทนี้เกิดขึ้นบ้าง แต่ยังคงต้องพึ่งพาสารและวัตถุดิบจากต่างประเทศ ทำให้ต้นทุนยังสูงและยังไม่ได้มีการพัฒนาด้านการแปรรูปเองเนื่องจากการขาดความรู้และสารเหล่านี้ สารเหล่านี้บางชนิดสามารถผลิตขึ้นเองได้โดยเฉพาะจากการใช้จุลินทรีย์ที่มีราคาถูกกว่าวิธีอื่น การพัฒนาสารเหล่านี้ขึ้นมาเองนอกจากเป็นการลดค่าใช้จ่ายแล้ว ยังก่อความรู้และสมบัติของสารเหล่านั้น ที่สามารถเป็นแนวทางในการพัฒนาหรือประยุกต์สารเหล่านี้ได้กว้างขวางกว่าการนำเข้าสารที่จำเพาะนั้นๆ สำหรับใช้ในการผลิตสารที่เฉพาะนั้นๆ ดังนั้นการสามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เองจะทำให้สามารถเกิดนวัตกรรมของการแปรรูปอาหารให้เป็นอาหารใหม่ๆ ที่มีสมบัติที่ต้องการ ทำให้อุตสาหกรรมอาหารขยายขอบเขตได้และยังทำให้ผู้ผลิตมีขีดความสามารถในการผลิตอาหารที่มีราคาสูงกว่าเฉพาะเพียงวัตถุดิบเปล่าๆ ได้อีกมาก อันเป็นการเพิ่มรายได้ให้ประชากรและประเทศชาติได้ต่อไป

พอลิเมอร์เป็นสารที่เกิดจากหน่วยย่อยมาเชื่อมต่อกัน ซึ่งพอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักกันดี ได้แก่ พอลิเพพไทด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน และพอลิแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมต่อกันโดยหน่วยย่อยของมอนอแซ็กคาไรด์ จำนวนพอลิเมอร์ย่อย (degree of polymerization) หากมีจำนวนมากจะทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีสมบัติอุ้มน้ำได้ (Morin, 1998) เมื่อพอลิเมอร์ละลายน้ำจะทำให้มีสมบัติ 2 ประการ คือ ก่อให้เกิดลักษณะข้นหนืด (thickening agent) หรือคอลลอยด์ และเกิดเป็นลักษณะเจล (gelling agent) (Mitchell, 1979) ซึ่งเป็นลักษณะที่พึงประสงค์ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทที่ต้องการความหนืดหรือข้น (Shih และคณะ, 2001; Ashiuchi และคณะ, 2004) พอลิแซ็กคาไรด์มีประโยชน์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร (Margaritis และ Pace, 1985) อุตสาหกรรมการทำความสะอาด การบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา

และใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร ฯลฯ (Yalpani, 1987) และยังมีสมบัติอื่นๆ อีกโดยขึ้นอยู่กับสมบัติเฉพาะตัวของพอลิแซ็กคาไรด์นั้นๆ ด้วยสมบัติที่หลากหลายทำให้สามารถนำพอลิเมอร์ไปใช้งานได้มากมาย เช่น ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้เสถียร สารจับเกาะ สารก่อเจล สารทำให้เลือดแข็งตัว สารหล่อลื่น สารขึ้นรูปฟิลม์ สารทำข้น สารช่วยในการแขวนลอย (Margaritis และ Pace, 1985) สารช่วยจับตกตะกอน (flocculation) และสารดูดซับ (absorption) (Yalpani, 1987) นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมทางด้านสรีรวิทยาที่หลากหลายในคน เช่น การต่อต้านมะเร็ง (anti-tumour) การต่อต้านไวรัส (anti-viral) และการต่อต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Calazans GMT, 1997) และสามารถเป็นตัวกระตุ้นสำหรับอินเตอร์ฟีรอน การยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด และการสังเคราะห์โคโลนีสทิมูเลทิงแฟกเตอร์ (Yun และ Park, 2003)

ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสามารถผลิตได้ทั้งจากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยแหล่งใหญ่ๆ ผลิตได้จากพืชและสัตว์ (Whistler และ Miller, 1993) สำหรับจุลินทรีย์นั้นเป็นแหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญเช่นกัน เพราะสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแตกต่างกันกว่า 200 ชนิด ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากพืชมีเพียง 25 ชนิด (Linton และคณะ, 1991) ในปัจจุบันการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์เริ่มมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีสมบัติเฉพาะตัวที่ดี เช่น แซนแทนกัมมีคุณสมบัติด้านความหนืด ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างที่กว้าง สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง (thermotolerance) และอีกประการที่สำคัญคือ ในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้ โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูกาล หรือมลพิษทางทะเล ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จำเป็นต้องคำนึงถึงเมื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย (จันทร์จนา ตันสกุล, 2539) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยควบคุมภาวะที่ใช้ในการหมัก และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็นจำนวนมาก ส่วนการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชยังมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งๆ มักจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ทำให้ต้องมีขั้นตอนในการแยกพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ต้องการออกมา ซึ่งส่งผลทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น (Whistler, 1993)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะให้การสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป (Paul, 1979) ส่วนใหญ่พอลิเมอร์จากแบคทีเรียจะเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อใช้เป็นชั้นแคปซูล (capsule) สำหรับป้องกันเซลล์ และเป็นอาหารสะสมไว้ใช้เมื่อขาด

แคลน (Shih และคณะ, 2001; Ashiuchi และคณะ, 2004) หรือบางชนิดที่สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์โดยละลายอยู่ในอาหารเหลวเรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ หรือเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exo-polysaccharide: EPS) จึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพราะง่ายต่อการสกัด และแยกออกจากผนังเซลล์ (Paul, 1979) สารพวกนี้แม้จะมีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และบางกรณีซับซ้อน แต่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ง่ายและรวดเร็วจากวัตถุดิบที่มีราคาถูก จึงมีการใช้สารเหล่านี้ในปริมาณมากแทนสารที่ต้องสังเคราะห์ทางเคมี (Stauffer และ Leeder, 1978)

อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการผลิตสารจำพวกพอลิเมอร์ที่ดำเนินการอยู่นั้นส่วนประกอบจำนวนมากยังต้องพึ่งพาจากต่างประเทศ ทำให้ต้องสูญเสียรายได้จากการนำเข้าสิ่งเหล่านี้ ดังนั้นหากสามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เอง ซึ่งทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ ผนวกกับการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูง ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดสามารถผลิตสารทางชีวรูปที่มีคุณค่าสูงโดยใช้วัสดุทางการเกษตรได้ ก็จะเป็นการผลิตสารเหล่านี้ได้เองในประเทศทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่ สารพวกเดกซ์แทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* สารพวกแซนแทนโดย *Xanthomonas campestris* (Stauffer และ Leeder, 1978) สารพวกเคอร์ดแลนโดย *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (Harada, 1977) สารพวกสเคลอโรกลูแคนโดย *Sclerotium roffsii* ฯลฯ (Harada, 1977; Stauffer และ Leeder., 1978) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยแบคทีเรียและรา ทั้งนี้พอลิเมอร์แต่ละชนิดก็มีข้อดีข้อด้อยภายในตัวมันเองตามชนิดการใช้งานที่ต้องการ

จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ที่พึงประสงค์ ได้แก่ 1) พอลิเมอร์ที่ผลิตได้ให้ความหนืดสูงที่ความเข้มข้นที่ต่ำ 2) ให้สมบัติทางกายรูปที่ดี 3) สามารถผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และ 4) พอลิเมอร์ถูกปลดปล่อยสู่อาหารเพาะเลี้ยงภายในเวลาอันสั้น (น้อยกว่าหนึ่งอาทิตย์) แต่เชื้อที่แยกจากธรรมชาติอาจให้ผลตรงเพียงบางข้อ จึงจำเป็นต้องมีการหาภาวะที่เหมาะสมเพิ่มด้วย จากข้อมูลนี้จะเห็นได้ว่า มีปัจจัยหลายประการที่สำคัญต่อการคัดเลือกเชื้อและชนิดของพอลิเมอร์ที่ต้องการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรม ทำให้สามารถแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่นได้ ซึ่งแม้ว่าสิ่งเหล่านี้มีรายงานการผลิตอยู่แล้วในประเทศอื่นๆ แต่ประเทศไทยมีวัตถุดิบในรูปผลิตผลการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เลี้ยงจุลิน ทรีย์ให้ผลิตสารเหล่านี้ได้ จึงเท่ากับเป็นการดำเนินการชนิดเพิ่มมูลค่าจากสิ่งเหลือใช้มาเปลี่ยนให้เป็นสิ่งที่มีราคา

สูงขึ้น และยังอาจได้สารชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์ได้ด้วย ความรู้ที่ได้รับจะทำให้สามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เอง เพื่อใช้อย่างน้อยที่สุดภายในประเทศแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ อันจะยังผลให้ผลผลิตมีราคาถูกลงสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นได้

การผลิตพอลิเมอร์โดยจุลินทรีย์ในปริมาณมากๆ นั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงความคุ้มทุน อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการผลิต ดังนั้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ที่ประกอบด้วย ซูโครส 4%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02%, K_2HPO_4 0.9%, KH_2PO_4 0.3%, สารสกัดจากยีสต์ 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%) จึงไม่เหมาะสำหรับการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในขนาดขยายส่วน ทั้งนี้สูตรอาหารระดับนี้หรือที่จะใช้ในอุตสาหกรรมควรมีราคาถูกและให้การเจริญตลอดจนการผลิตสารที่ต้องการได้ดี ปกติแล้วการพิจารณาสูตรอาหารนั้น ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงอย่างมาก คือ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาจเตรียมได้จากผลิตภัณฑ์เหลือใช้ทางการเกษตร ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนยังอาจเป็นชนิดอินทรีย์ อนินทรีย์ หรือร่วมกัน โดยไนโตรเจนอินทรีย์ก็สามารถเตรียมได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือแหล่งที่มีราคาถูกอื่นๆ ได้

สืบเนื่องจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม หลังฤดูการเก็บเกี่ยวแต่ละปีจะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ ชานอ้อย กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวันเหลือเป็นจำนวนมาก และจากการที่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ (ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ และชานอ้อย) มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ เช่น ชานอ้อย มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากถึง 33-41% (Paturua, 1989) ฟางข้าวมีเซลลูโลสมากถึง 32.1-36% (Virkola, 1975) เป็นต้น จึงมีการศึกษาเพื่อนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นสับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอะซีติก และกรดอินทรีย์อื่น ๆ ส่วนกากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวันก็มีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน (สุภาพร ชาติวรพงศา, 2536) เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ และชานอ้อย มาย่อย (hydrolyze) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้น้ำตาลออกมา (Parisi, 1989) โดยถ้าย่อยเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียว คือ กลูโคส แต่ถ้าการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน

ข้อดีของการใช้เอนไซม์ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ ภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างไม่รุนแรง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกย่อยเปลี่ยนเป็นสาร เช่น เฟอร์ฟูรัล ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น สามารถหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนการกัดกร่อนหรือราคาแพง แต่การย่อยด้วยเอนไซม์ต้องมีการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาผ่านการปรับสภาพก่อนเพื่อเป็นการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยการทำลายโครงสร้างผลึกในเซลลูโลสและสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต กำจัดลิกนิน เพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ง่ายขึ้น และเพิ่มจำนวนพันธะไกลโคซิดิกเพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ง่าย (Dekker และ Wallis, 1983; Parisi, 1989) ทั้งนี้เพื่อให้ได้น้ำตาลใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป ในการศึกษานี้ได้ให้สูตรอาหารใหม่ที่ปรับมาจากสูตรเดิมของ Bromfield และ Tallgren โดยเว้นสารสกัดจากยีสต์ซึ่งมีราคาแพงออกจากสูตรหลังการปรับสูตร และหลังจากใช้เลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันแล้วพบว่ายังคงให้ผลผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์พอลิเมอร์ที่สูงเช่นเดิม

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาใช้ในการผลิตอาหาร ตัวอย่างเช่น bifidobacteria และ propionibacteria สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ ซึ่งปัจจุบันถูกพิจารณาเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ เช่น ในผลิตภัณฑ์นมและมีสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์ (Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) ทั้งนี้พอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ทันที เพราะแลคติกแอสิดแบคทีเรียจัดเป็น Food-Grade Bacteria และได้รับการรับรองให้เป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) คือมีความปลอดภัยสำหรับการบริโภค (Mogensen และคณะ, 2002) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวนมากที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้และเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมอยู่ภายนอกเซลล์ (exopolysaccharides) ดังนั้นจึงแยกจากการหมักได้ง่าย นอกจากนี้แลคติกแอสิดแบคทีเรียยังเป็นจุลินทรีย์ประเภท Facultative anaerobe คือ จุลินทรีย์ที่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโตต่ำ ซึ่งลักษณะนี้ทำให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียมีความน่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (สุวิมล และคณะ, 2540)

จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติโดยเฉพาะแบคทีเรีย ตามปกติแล้วจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจะต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปมักทำการเลือกอาหาร และเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีนี้จะถูก

จำกัดโดยความสามารถสูงสุดในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน (gene) ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรม นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะการผลิตแล้ว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ยังเป็นสิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตอีกด้วย โดยการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้การชักนำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี N-methyl-N-nitrosoguanidine (NTG) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีค่าใช้จ่ายต่ำ และเป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป โดยการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่คัดแยกได้ซึ่งให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พอลิเมอร์ที่สูงมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำมากลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตด้วยขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วคัดเลือกโคโลนีของสายพันธุ์กลายที่มีขนาดโคโลนีใหญ่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง มีความเยิ้มของโคโลนี แล้วยืนยันผลโดยการเลี้ยงและตรวจผลผลิตในอาหารเหลว และทำการกลายพันธุ์รอบต่อไปและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีสมบัติที่กล่าวถึงข้างต้นจนได้สายพันธุ์ที่ต้องการ จากการที่การกลายพันธุ์โดย UV นั้นมักเกิดการย้อนกลับ (revert) ซึ่งจะทำให้ผลผลิตที่เคยสูงอาจลดลง วิธีการหนึ่งในการป้องกันการย้อนกลับคือ การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีเพื่อให้เกิดความเสถียรทางพันธุกรรมและยังอาจให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงได้กลายพันธุ์สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ด้วยสารเคมี NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตที่สูงโดยอาจทำการกลายพันธุ์รอบต่อๆ ไปด้วย

การศึกษาทดลองภายในห้องปฏิบัติการนั้น โดยทั่วไปนิยมเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระดับขวดเขย่า เนื่องจากสามารถทำเป็นจำนวนมากหลายๆการทดลองได้ ไม่ยุ่งยาก และมีโอกาสปนเปื้อนน้อย จึงช่วยให้สามารถศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับเมแทบิลิซึม ผลของอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ การเติมสารชนิดต่างๆ และการปรับความเป็นกรดด่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นก่อนที่จะพัฒนากระบวนการหมักไปจนถึงระดับอุตสาหกรรมได้ จะต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆเหล่านี้ในถังหมักขนาดเล็กระดับห้องปฏิบัติการก่อน เนื่องจากถังหมักระดับห้องปฏิบัติการนี้มีลักษณะคล้ายกับถังหมักที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพียงแต่มีขนาดเล็กกว่า จึงทำให้สามารถศึกษาปรับปรุงภาวะต่างๆให้เหมาะสมได้ โดยที่เสียค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก ก่อนที่จะขยายไปสู่การผลิตในระดับขยายส่วน และระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กระบวนการหมักแบบแบตช์ เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้จะทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้น

ปริมาณจำกัด และเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในระบบแล้วจะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆเพิ่มลงไปอีก เซลล์จะเจริญจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เป็นต้น จากการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์นี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ต่อไปได้

สำหรับประเทศไทยแล้ว พอลิเมอร์ที่ใช้กันอยู่ยังต้องอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สูญเสียรายได้จากการนำเข้าสารเหล่านี้ การผลิตขึ้นเองเพื่อใช้งานในด้านต่างๆ ย่อมเป็นการลดค่าใช้จ่ายและเป็นการพึ่งพาตนเองได้ จากที่มีการดำเนินการวิจัยในเรื่องนี้มาระดับหนึ่ง โดยได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิเมอร์ของแบคทีเรียเหล่านี้ ปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการกลายพันธุ์ให้ได้ผลผลิตที่สูง แต่งานทั้งหมดนั้นดำเนินการในระดับขวดเขย่า จากนั้นได้พัฒนาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขยายส่วน โดยการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับถังหมัก แล้วศึกษาสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากถังหมัก เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

งานวิจัยที่ผ่านมาในช่วงแรกทางคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชที่ให้ความหวานที่ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ตัวอย่างอ้อย จำนวน 9 ตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ งานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ จากนั้นคัดกรองสายพันธุ์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูง อันได้แก่สายพันธุ์ EN02 เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียผลิตได้โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบชนิดเดียว โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.7091 จากการตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ได้เป็น *Enterobacter cloacae* และเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ EN02 ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย ซูโครสความเข้มข้น 4.0% $(NH_4)_2SO_4$ความเข้มข้น 1.0% และยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ภายใต้ภาวะที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้ว พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 พบว่า มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เท่ากับ 88.94 เปอร์เซนต์ และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.29 เปอร์เซนต์ เมื่อทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์บางส่วนและหาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีประจุลบ (acidic polysaccharide) และจากการตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรด โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และวิธีหาความยาวคลื่นด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายประกอบด้วยไซโลสเท่านั้น ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่แสดงว่าแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยมีมอนอแซ็กคาไรด์ คือ ไซโลส เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำแบคทีเรียไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไปในอนาคต

ต่อมาคณะผู้วิจัยได้พัฒนาสูตรอาหารใหม่เพื่อลดต้นทุนการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เป็นสายพันธุ์ทดสอบ พบว่า สูตรอาหารที่ดีที่สุดในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย ซูโครส 30 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 9 กรัม และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัม ภายใต้ความเป็นกรดด่าง 6.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9-12 ชั่วโมง พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรปรับปรุง ภายใต้ภาวะข้างต้นประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นที่อาจจะเป็นน้ำตาลกาแลคโทสเพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเดียวกับเมื่อผลิตจากอาหารสูตรเดิม อุณหภูมิหลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 227.5 องศาเซลเซียส

ด้วยสมบัติที่หลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อตอบสนองความต้องการสำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ตามความต้องการของอุตสาหกรรมต่างๆ คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ รวมทั้งประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติเพิ่มเติม แบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกจากตัวอย่างผลไม้ ได้แก่ CU-CH1, CU-CH4, CU-E3, CU-F6, CU-M2, CU-M4 และ CU-M5 ซึ่งพบต่อไปว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเหล่านี้มีทั้งที่เป็นชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ และฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และทั้งหมดมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH1, CU-CH4 สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณภูมิห้องและมีความหนืดสูง อีกทั้งยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง เป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันถั่วเหลืองสูงสุด และมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 2.380 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึง

ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และสมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้งหมด 7 สายพันธุ์ จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มาทำการศึกษาต่อ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยาหรือการทดสอบทางชีวเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 มีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* และผลการวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์พบว่ามีประจุสุทธิเป็นลบ มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 87.5% และ 2.8% ตามลำดับ จากนั้นทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบและเจลฟิลเทรชัน พบว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 เป็นลำดับส่วนหลักโดยมีมวลโมเลกุลมากกว่า $2x10^6$ ดาลตัน การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปียืนยันว่า EPS-2 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ และจาก 1H-NMR สเปกตรัม พบว่ามีสัญญาณของ anomeric proton non-anomeric proton และมีการเชื่อมต่อกันของน้ำตาลเป็นแบบ □D-configuration โดยพอลิแซ็กคาไรด์ EPS-2 มีน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโทส เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบย่อย นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์นี้มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆได้ ซึ่งจากสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ศึกษามาอาจเป็นทางเลือกสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

เนื่องจากงานวิจัยในช่วงปีแรกแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นอาจยังไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทางผู้วิจัยจึงได้เปรียบเทียบลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 เพิ่มเติม พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม LAB มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่ากลุ่ม EN และ EP ประมาณ 4-5 เท่า โดยมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงถึงประมาณ 8.71–10.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าไม่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และไม่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีเท่ากับแบคทีเรียกลุ่ม EN และ EP ในขณะเดียวกันมีลักษณะสมบัติบางประการที่เหมาะสมซึ่งสามารถใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในสารละลายอะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอล ผลิต Glucan ได้ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทางอุตสาหกรรมได้ อีกทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ไม่ก่อเกิดอันตราย และมีความน่าสนใจ ซึ่งสามารถนำไปใช้ใน

อุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มาทำการศึกษาสมบัติเพิ่มเติม สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 นั้น พบว่ามีประจุสุทธิเป็นกลาง ไม่มีความสามารถในการเกิดเจล แต่มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ และมีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติเหมือนกันกับแบคทีเรีย *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) จึงเรียกแบคทีเรียนี้ว่า *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *W. confusa* สายพันธุ์ LAB1 พบว่า เมื่อหาภาวะเหมาะสมของอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ MRS ที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วน Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract มีค่าเท่ากับ 0.5 : 0.5 : 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีการผลิตได้ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสูตรอาหารดัดแปลงใหม่สูงกว่าอาหารสูตรเดิมคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 28.54% การศึกษารูปแบบการเจริญของ *W. confusa* สายพันธุ์ LAB1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่จากข้างต้น พบว่า สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พร้อม ๆ ไปกับการเจริญ จึงสรุปได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตเป็นสารเมทาบอไลต์แบบปฐมภูมิ (Primary metabolite) โดยเริ่มมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงเมื่อเชื้อเจริญในระยะ stationary phase และเข้าสู่ภาวะคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อ 18 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนั้น ต้องการแบคทีเรียที่สามารถให้ผลิตผลในปริมาณสูง ซึ่งนอกจากการปรับปรุงสูตรอาหาร และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว การกลายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมในความพยายามทำให้แบคทีเรียนี้ผลิตพอลิเมอร์ได้สูงขึ้น ทางคณะผู้วิจัยได้กลายพันธุ์แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ได้คัดเลือกโคโลนีที่รอดชีวิตในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม คัดเลือกโคโลนีโดยดูจากลักษณะของโคโลนีที่มีความเป็นเมือกเยิ้มมากกว่าโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยคัดเลือกแบคทีเรีย

สายพันธุ์ UV1-8 และสายพันธุ์ UV1-9 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายจากโคโลนีที่รอดชีวิตในช่วงที่เหมาะสมแล้ว ได้นำมาศึกษาต่อถึงความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 4% เป็นแหล่งคาร์บอน เทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อกลายพันธุ์แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-8 และสายพันธุ์ UV1-9 ด้วยสาร NTG ได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-8/NTG7 และสายพันธุ์ UV1-9/NTG3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายจากโคโลนีที่รอดชีวิตในช่วงที่เหมาะสมแล้ว ได้นำมาศึกษาต่อถึงความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 4% เป็นแหล่งคาร์บอน เทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมจากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าแบคทีเรียที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG โดยที่แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-8 และสายพันธุ์ UV1-9 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 8 เท่า และ 12 เท่า ตามลำดับ

จากการทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ได้สูงขึ้นโดยทำการกลายพันธุ์แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณมากที่สุด คือ สูงกว่าสายพันธุ์ดังเดิมถึง 12 เท่า จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มาศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ การศึกษาหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง ความสามารถในการละลายน้ำ ความหนืด ความสามารถในการอุ้มน้ำ และความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ พบว่า เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบไปด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และไซโลส มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณภูมิห้องและมีความหนืดสูง มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง เป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน จากนั้นจึงศึกษาต่อถึงการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 85.3% และ 5.8% ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 11.50 กรัมต่อลิตร และเพื่อการผลิตในระดับถังหมัก จึงต้องมีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการศึกษาหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยกำหนดให้แหล่งคาร์บอนคงที่ที่ 4% แล้วแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 5, 20, 60, 100 และ 200 ตามลำดับ ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส และแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ ในเบื้องต้นพบว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ ค่า C/N เท่ากับ 5 และ 200 โดยให้ค่าเฉลี่ยในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ตลอดระยะเวลา 36 ชั่วโมง เท่ากับ 0.3488 และ0.2254 ตามลำดับ และเนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มี 2 แหล่ง ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และ

สารสกัดจากยีสต์ จึงใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 มาทำการทดลองต่อ โดยผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N เท่ากับ 5 และ 200 ในภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว และสองชนิดตามลำดับ จากการทดลองพบว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 ในภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือให้ค่าเฉลี่ยในการผลิตตลอดระยะเวลา 24ชั่วโมง เท่ากับ 0.2175 จึงใช้อาหารกำหนดสูตรที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 ในการผลิตในระดับถังหมักต่อไป

บทที่ 2

ขั้นตอนการดำเนินการ

1. การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก และศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

1.1 ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

1.2 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ

1.3 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า

1.4 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก

1.5 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

2. การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

2.1 คัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

2.2 ผลิตและสกัดแยกเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้

2.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก และศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

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

1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

1.2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

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

1.2.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

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

1.3 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

1.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อบริสุทธิ์ในข้อ 3.2.1 มาใช้เป็นหัวเชื้อโดยถ่ายแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

1.3.2 การผลิต สกัดแยก และการทำพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

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

1.4 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ

1.4.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่

ได้มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ วัดค่าความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.2 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.3 และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามข้อ 1.5.4

1.4.2 ศึกษาความเสถียรในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีดังข้อ 1.3.1 และ 1.3.2 ในวันที่ 1 3 7 15 30 60 90 และ120 ทำการทดลอง 3 ซ้ำนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.3 และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4

1.5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า

1.5.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 โดยมีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลซูโครส และแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4ปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 1.5.5 และปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 1.5.6

1.5.2 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 1.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6

ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4 ปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 1.5.5 และปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 1.5.6โดยแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจน ดังต่อไปนี้

- ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$
- ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

1.5.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

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

1.5.4 การวิเคราะห์น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์

การผลิต สกัดแยก และทำพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีในข้อ 1.3.2 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปชั่งเพื่อคำนวณหาน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

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

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในหน่วยกรัมต่อลิตร

1.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kemper (1974)

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

1.6 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก

1.6.1 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 1.5.2 โดยแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่

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

โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4 ปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 1.5.5 และปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 1.5.6

1.6.2 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์(2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) ลงในถังหมักที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรข้างต้นที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 1.6.1 โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร แปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4 และปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 1.5.5

1.6.3 ศึกษาอัตราเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) ลงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรข้างต้นที่มีการปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.6.1 บรรจุอยู่ โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร แปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ600 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยเลือกอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมตามข้อ 1.6.2 มาใช้ในการศึกษา โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.5.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4 และปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 1.5.5

1.6.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังข้อ 1.3.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่พัฒนาโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยดัดแปลงสูตรของ Bromfield ร่วมกับ Tallgren และคณะ (1998) ลงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรข้างต้นที่มีการ

ปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 1.6.1 บรรจุอยู่ โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร ใช้อัตราการให้อากาศ และอัตราเร็วใบกวนที่เหมาะสมตามข้อ 1.6.2 และ 1.6.3 ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 1.3.3 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ตามข้อ 1.5.4 และปริมาณน้ำตาลรวมตามข้อ 1.5.5

1.6.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก

นำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณน้ำตาลรวม จากการศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่าตามข้อ 1.5.1 และ 1.5.2 และการผลิตในระดับถังหมักตามข้อ 1.6.1 1.6.2 1.6.3 และ 1.6.4 มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย ดังนี้

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

1.7 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

1.7.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

1.7.1.1 ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยกรดซัลฟูริก

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้เป็นมอโนแซ็กคาไรด์จากนั้นรอให้เย็นและปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด

ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และ1 โมลาร์ ตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน แล้วจึงนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยเก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (วิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549)

1.7.1.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ในการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ใช้คอลัมน์Sugar SZ5532ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

1.7.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

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

1.7.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ต่อ

ระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้หรือเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) ทำการทดลอง 3 ซ้ำสำหรับการแปรผล ถ้าเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงถึง ความสามารถในการอุ้มน้ำสูง โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น (Tako และคณะ, 1982)

1.7.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้องทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น จากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

1.7.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

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

1.7.6 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Cooper และGoldenberg, 1987)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 1:1

นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์จากระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟเออร์และคำนวณหาค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsification index (E_{24})) จากสูตรข้างล่างดังนี้

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

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

นำสารละลายแขวนลอยดินขาว (Kaolin clay) ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมกับแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรโดยมีการแปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5 10 15 20 25 30 35 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนน้ำใสชั้นบน (upper phase) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) จากสูตรข้างล่างดังนี้

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

1.7.8 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

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

1.7.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

1.7.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำจากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.7.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie blue ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำจากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.7.10 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์

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

2. การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

2.1 คัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากผักดอง

คัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม ชลบุรี และอุดรธานี ตัวอย่างอาหารหมัก ได้แก่ ผักกาดดอง 5 ตัวอย่าง หน่อไม้ดอง 6 ตัวอย่าง และมะนาวดอง 1 ตัวอย่าง คัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างโดยการนำลูปเขี่ยตัวอย่างแล้วนำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนี แล้วนำไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่รอบโคโลนีเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงว่า มีการสร้างกรด นำโคโลนีนั้นไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยสังเกตุจากโคโลนีที่มีลักษณะเมือกเยิ้ม (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) เก็บรักษาสายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตกเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อนำไปผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

2.2.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

ขีดเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 2.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์

2.2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เขี่ยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 2.1 ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มี 4%ซูโครส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.3 การผลิตและสกัดแยกเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดที่คัดแยกได้

2.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตเอกโซพอลิแซกคาไรด์

นำเชื้อแลคแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากข้อ 2.2.1 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มี 4%ซูโครส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อข้างต้นลงใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

2.3.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 2.3.1 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.3.3 การสกัดแยกเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3.2 มาสกัดแยกเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อตกตะกอนเซลล์และโปรตีน (Lin และ Chien, 2007) นำไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลเย็น ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนประมาณ 18 - 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที (Kumar และคณะ , 2004) เก็บตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลเย็น ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีกครั้ง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที เก็บตะกอนพอลิ

แซ็กคาไรด์ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งที่อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นนำไปใส่ในเดซิเคเตอร์เพื่อให้น้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ รายงานเป็นหน่วย กรัมต่อลิตร

2.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

2.4.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

2.4.1.1 การย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดซัลฟูริก

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากข้อ 2.3.3 มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดฝาเกลียว แล้วใส่กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร 1 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

2.4.1.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ในการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

2.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

2.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie blue ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4.3 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n- บิวทานอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น จากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

2.4.4 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำเหมือนข้างต้นโดยจุ่มในน้ำกลั่นอีกหนึ่งชุด จากนั้นวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่เคลื่อนที่ได้ ต่อระยะทางของน้ำกลั่นที่เคลื่อนที่ได้ หรือเรียกว่า เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ถ้าเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงถึง ความสามารถในการอุ้มน้ำสูง โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น (Tako และคณะ, 1982)

2.4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผสมด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก และศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

1.1 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

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

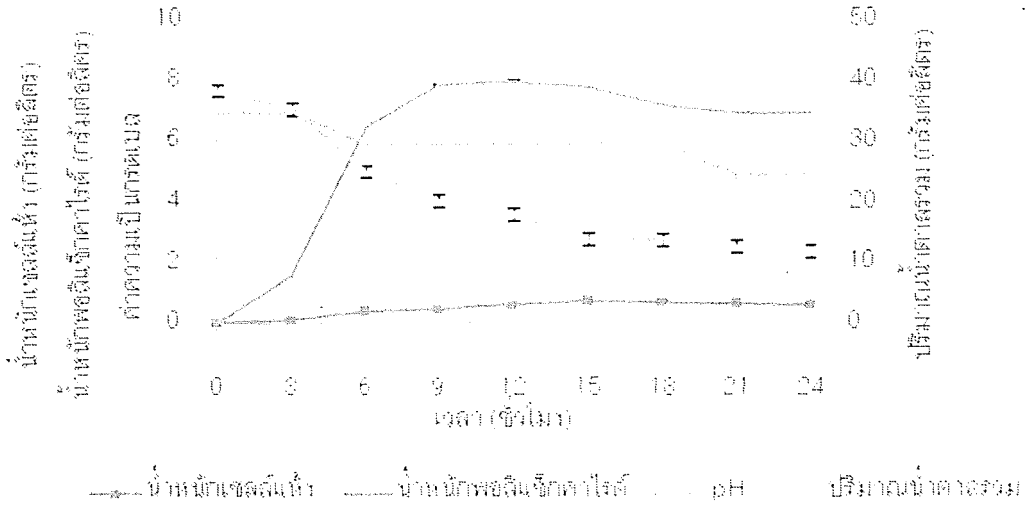
ต่อมางานวิจัยของ ณฤดี อัศวเสรีเลิศ (2552) ได้ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี N-methyl-N-nitrosoguanidine (NTG) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกลายพันธุ์ได้มาทั้งหมด 8 ชนิด เมื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด ในภาวะการเลี้ยงเชื้อระดับขวดเขย่า ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยอัตราการบ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 7.15 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า เพื่อนำภาวะที่เหมาะสมไปศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E.*

cloacae สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

1.1.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และค่าความเป็นกรดด่าง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณน้ำตาลรวม และค่าความเป็นกรดด่างของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

จากรูปที่ 1 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 ซึ่งเป็นระยะ log phase และมีเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ในส่วนของค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณน้ำตาลรวม พบว่ามีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5และมีปริมาณน้ำตาลรวมคงเหลือเท่ากับ 12.067 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณารูปแบบของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามีการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (growth-associated) โดย

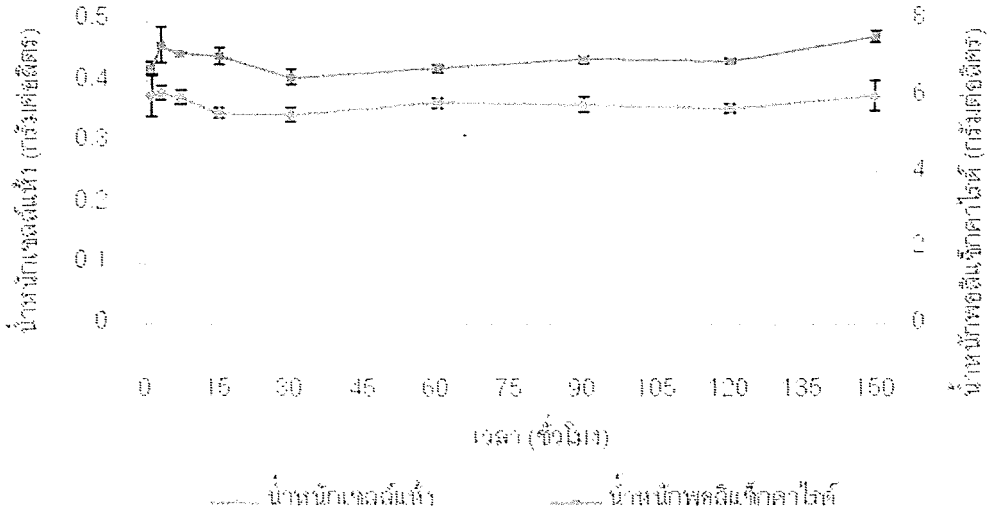
สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 8.051 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จึงเป็นสารเมทาบอไลท์แบบปฐมภูมิ (primary metabolite)

1.1.2 ศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที วันที่ 1 3 7 15 30 60 90 120 และ150 นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 และในรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน

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



รูปที่ 2 ความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในช่วงเวลา 150 วัน

จากตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 0.382 กรัมต่อลิตร และน้อยที่สุดเท่ากับ 0.346 ซึ่งเมื่อพิจาณาแล้ว พบว่ามีค่าต่างของน้ำหนักเซลล์แห้งไม่เกิน 0.036 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 7.578 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตได้น้อยที่สุดเท่ากับ 6.516 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ค่าต่างไม่เกิน 1.062 กรัมต่อลิตร ดังนั้น ในช่วงเวลา 150 วันที่ทำการทดลอง แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จึงมีความเสถียรของการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังแสดงในรูปที่ 2

1.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขวดเขย่า

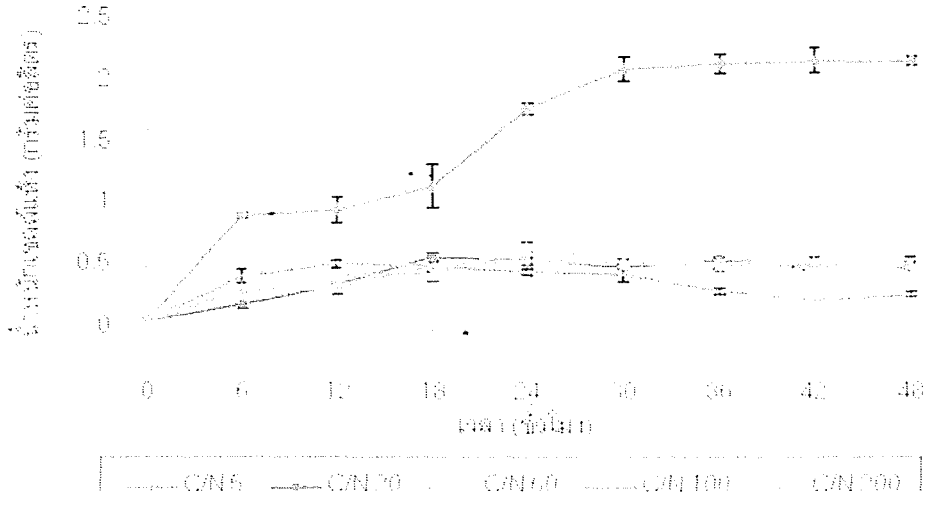
1.2.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่แปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส และแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียม

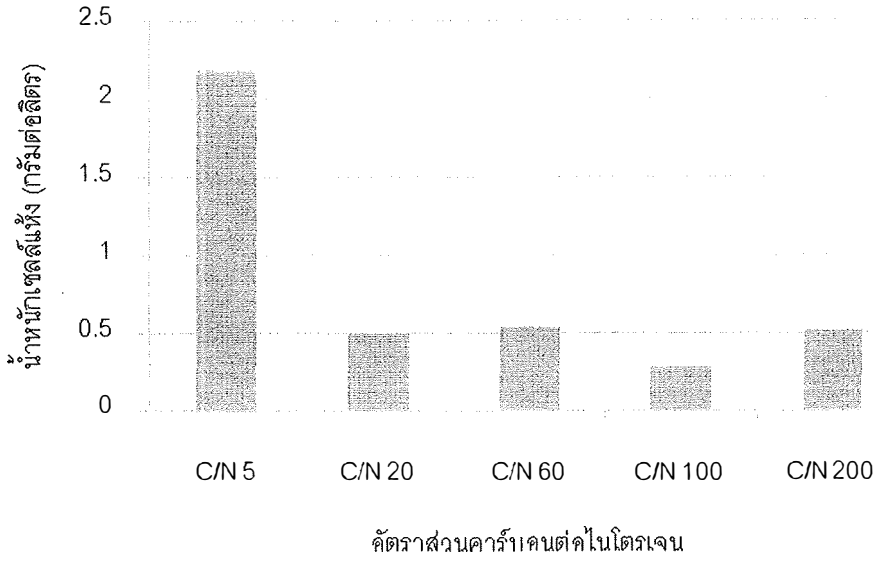
ซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณไนโตรเจนได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4

ตารางที่ 2 ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อมีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน

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

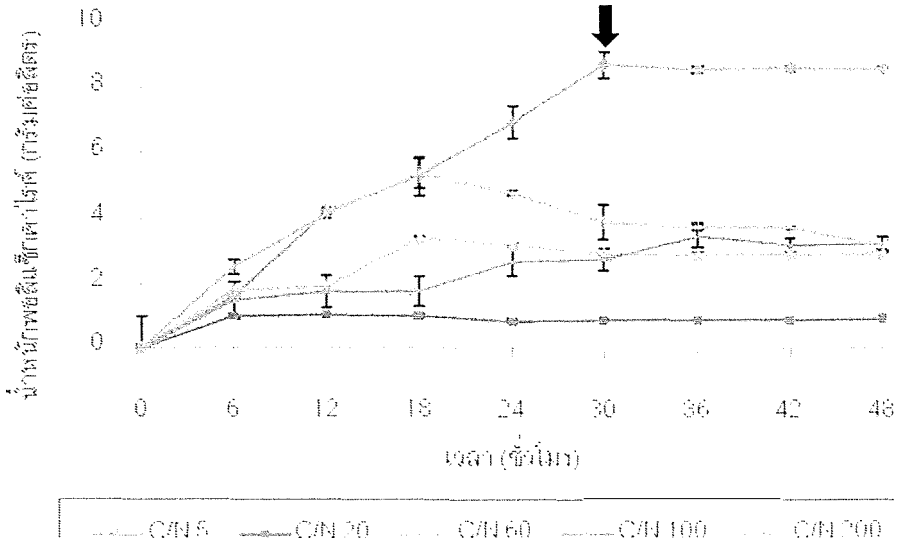


รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



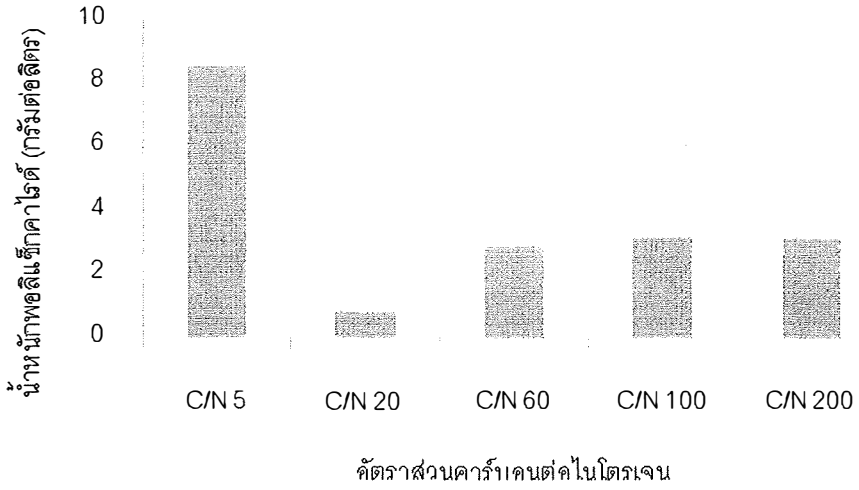
รูปที่ 4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200

จากรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีแนวโน้มของการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีการเจริญสูงสุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.187 กรัมต่อลิตร และที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 มีการเจริญน้อยที่สุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.279 กรัมต่อลิตร

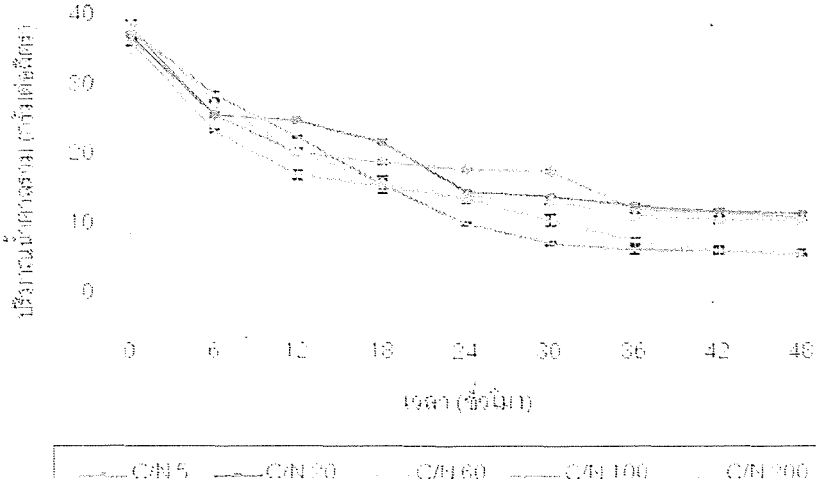


รูปที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีแนวโน้มของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 8.692 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 และเมื่อสิ้นสุดการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 6) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ คือสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 8.555 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 มีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 0.848 กรัมต่อลิตร



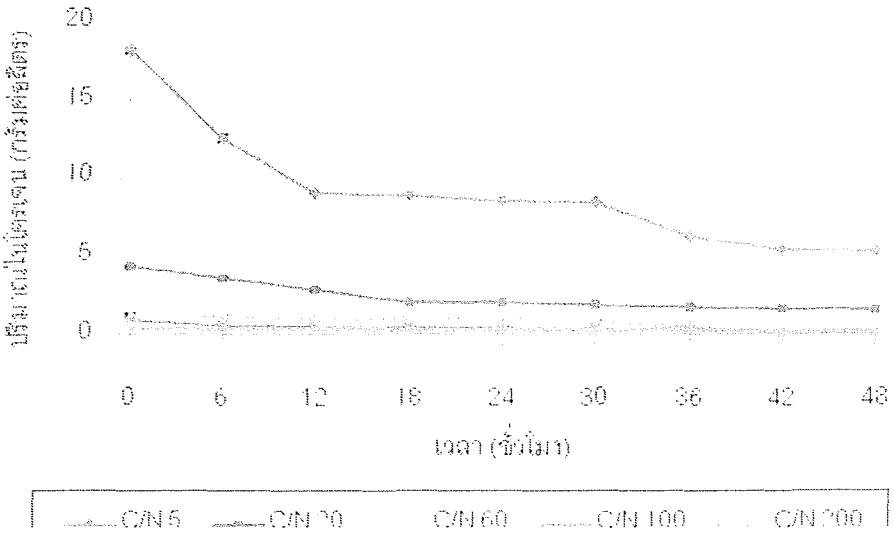
รูปที่ 6 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 20 60 100 และ 200



รูปที่ 7 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากรูปที่ 7 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-12 ของทุกๆ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 7 ที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในระยะดังกล่าว และหลังจากเข้าสู่ช่วง stationary phase น้ำตาลจะมีปริมาณค่อนข้าง

คงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 พบว่าภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 และ 200 เชื้อมีการใช้น้ำตาลได้ดี โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ เท่ากับ 6.216 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 8 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งยังคงมีปริมาณไนโตรเจนคงเหลืออยู่เล็กน้อยดังแสดงในรูปที่ 8

จากการศึกษาผลของการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมแสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และเมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ 200 มีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (specific growth rate; μ (h^{-1})) อัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate; ρ (g-EPS/g-CDW/h)) ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูก

ใช้ไป ($Y_{x/s}$; g-CDW/g-sugar) ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$; g-EPS/g-sugar) และความสามารถในการผลิต (productivity; g-EPS/l/h) ที่เหมาะสม ดังนั้น จึงเลือกใช้การแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

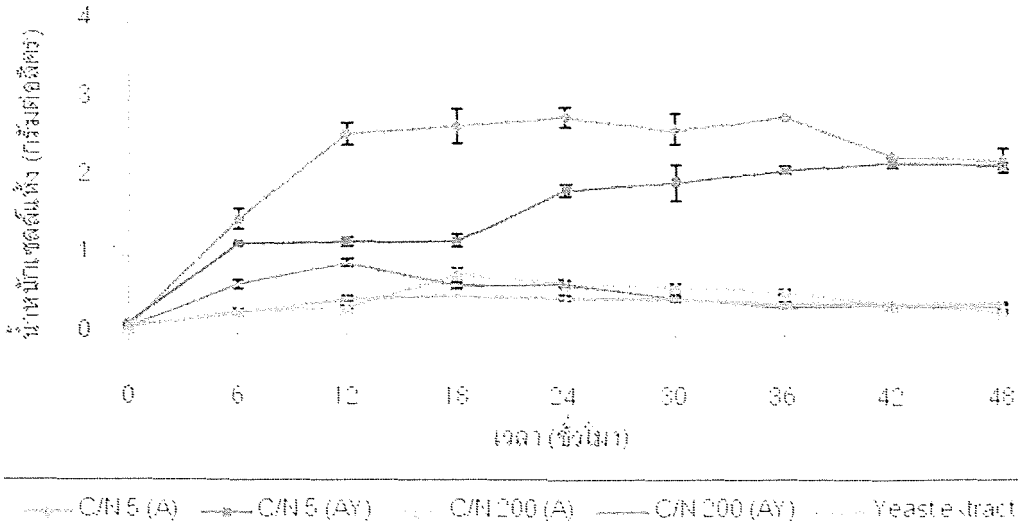
เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 1.2.1 มาแปรผันการเติมแหล่งไนโตรเจน ดังต่อไปนี้

- ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนครบทั้งสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- ในภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]
- ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

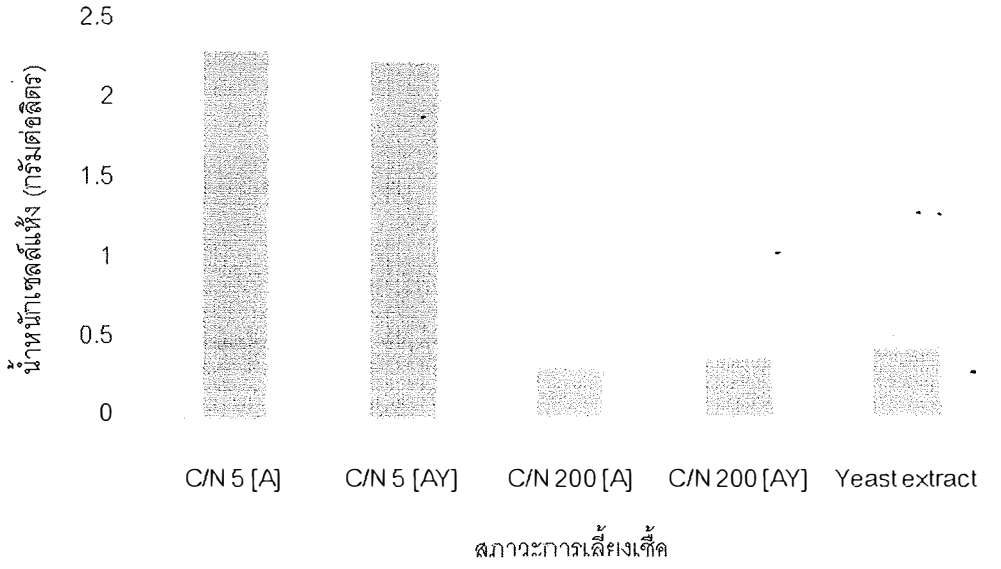
เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณน้ำตาลรวม และปริมาณไนโตรเจน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 9-14

ตารางที่ 3 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 20 60 100 และ 200

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

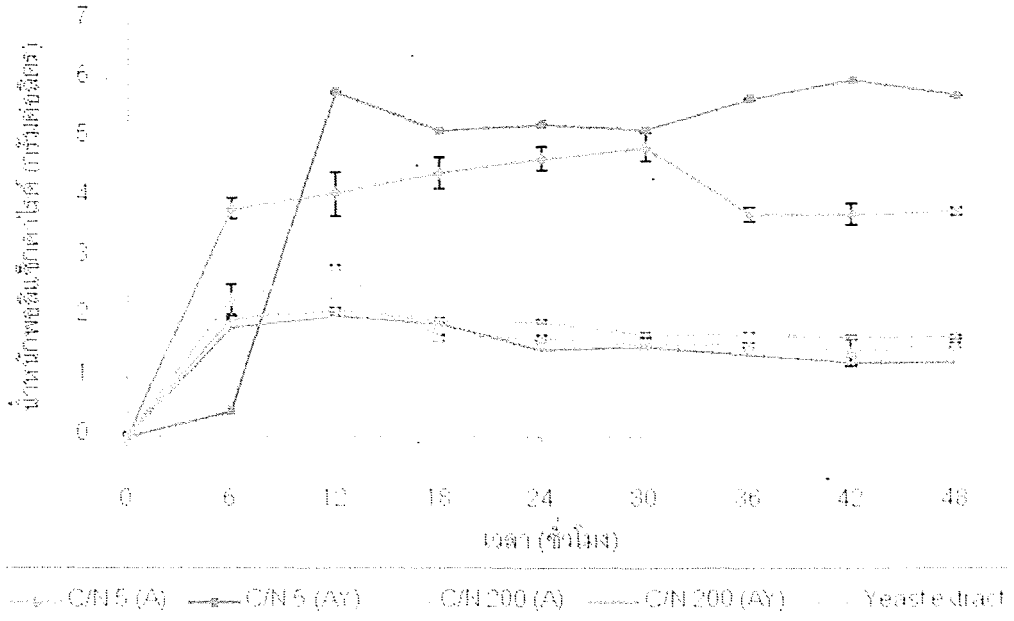


รูปที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



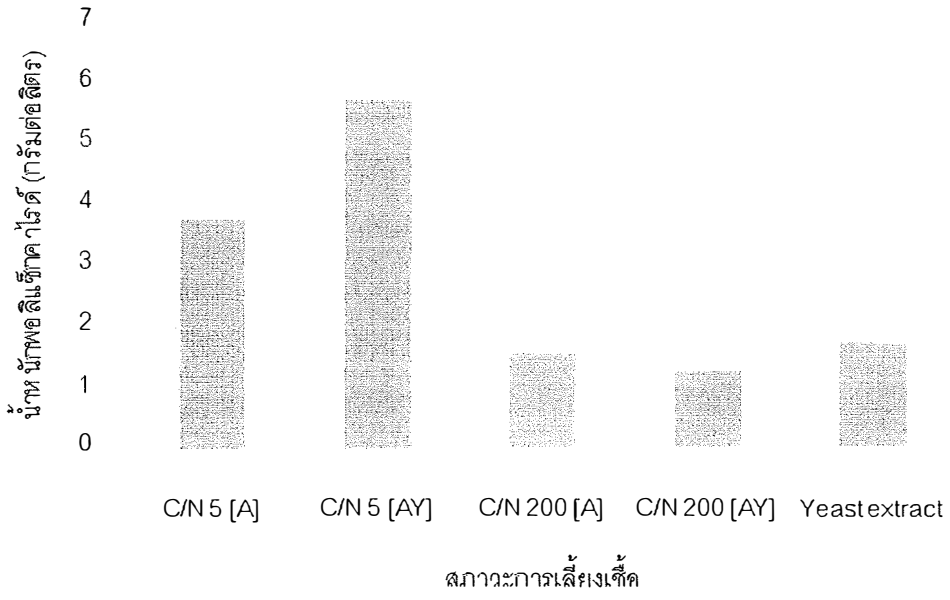
รูปที่ 10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y

จากรูปที่ 9 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ในภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว มีแนวโน้มของการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 10) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ในภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวยังมีการเจริญสูงสุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.317 กรัมต่อลิตร

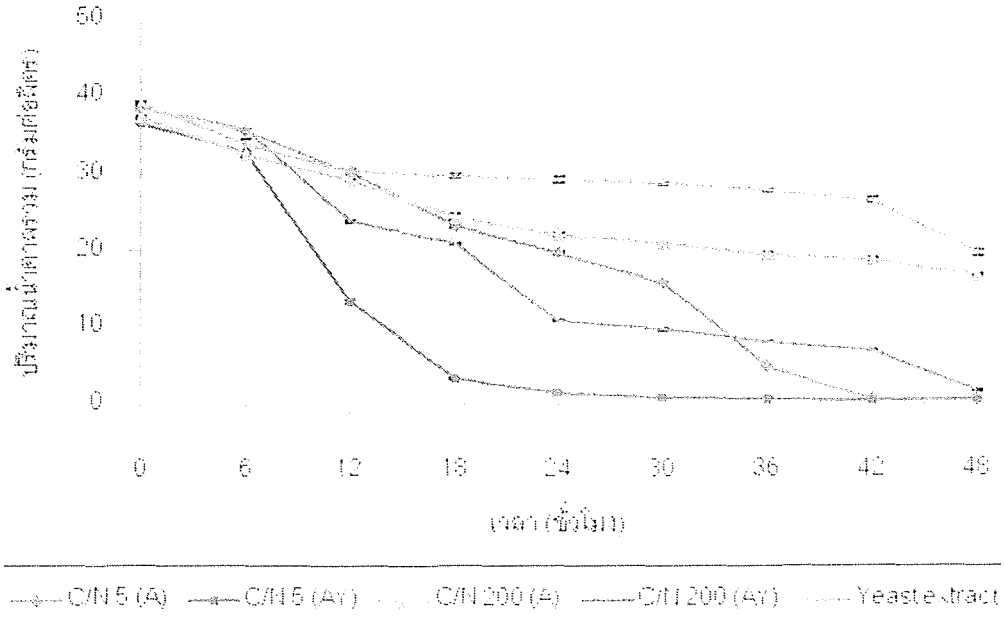


รูปที่ 11 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน มีแนวโน้มของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 5.999 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และเมื่อสิ้นสุดการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 12) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ที่มีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ คือสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 5.728 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 1.246 กรัมต่อลิตร

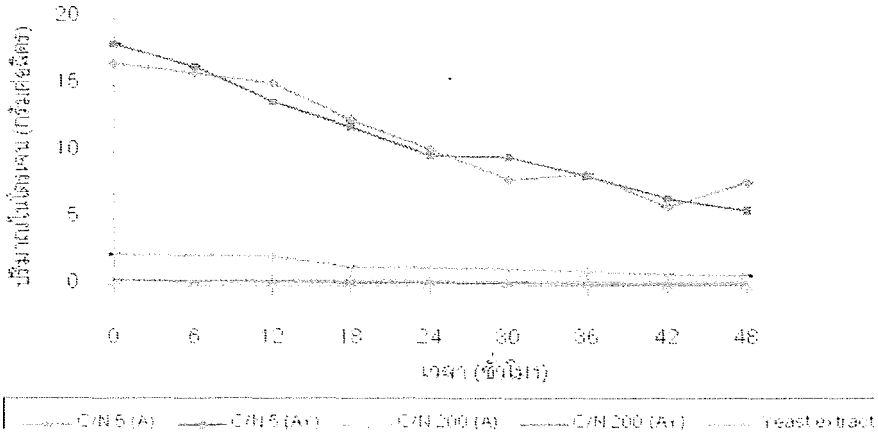


รูปที่ 12 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200



รูปที่ 13 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Y เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากรูปที่ 13 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-18 ของทุกๆภาวะการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 9 ที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในระยะดังกล่าว และหลังจากเข้าสู่ช่วง stationary phase น้ำตาลจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 48 พบว่าภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ทั้งสองภาวะคือ ภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ และภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีการใช้น้ำตาลได้ดี โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ เท่ากับ 0.563 และ0.606 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 14 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; AY, ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน; A และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน; Yเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 ร่วมกับการศึกษาผลของการเติมไนโตรเจน พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งยังคงมีปริมาณไนโตรเจนคงเหลืออยู่เล็กน้อยดังแสดงในรูปที่ 14

จากการศึกษาผลของการเติมไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว หรือทั้งสองชนิดร่วมกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และเมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4 พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5และ200 ในภาวะที่ใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดร่วมกัน และภาวะที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว มีค่าจลนศาสตร์ที่ใกล้เคียงกัน สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมนั้น เมื่อคำนึงถึงการลดต้นทุนในการผลิตแล้ว การใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวจึงเหมาะสมกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้การแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

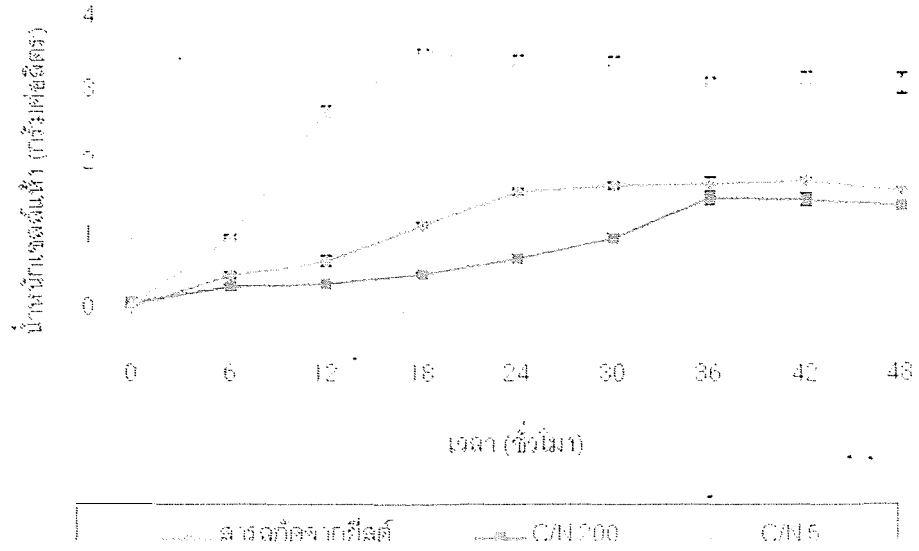
ตารางที่ 4 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (A) ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (Y) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (AY) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200

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

1.3 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับถังหมัก

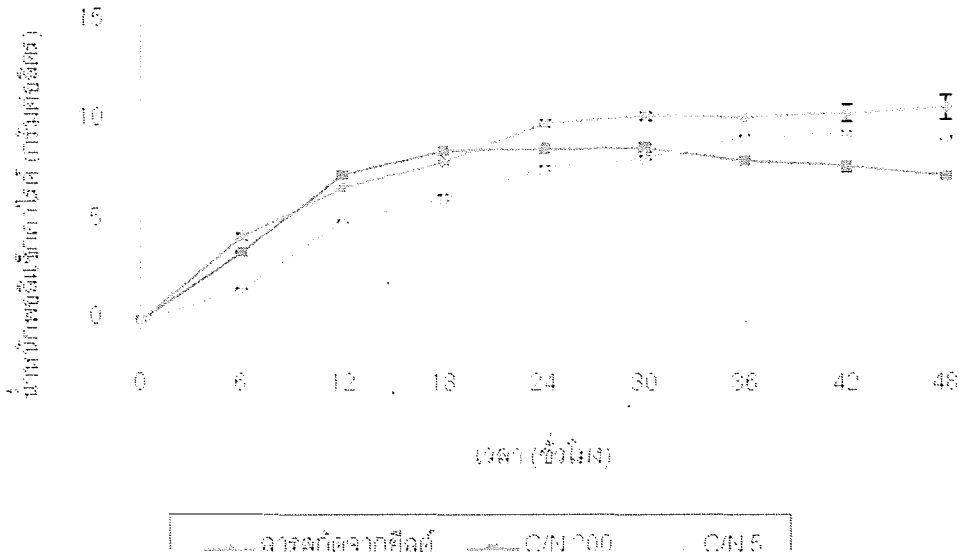
1.3.1 ศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 3.2.2 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณน้ำตาลรวม และปริมาณไนโตรเจน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15-18



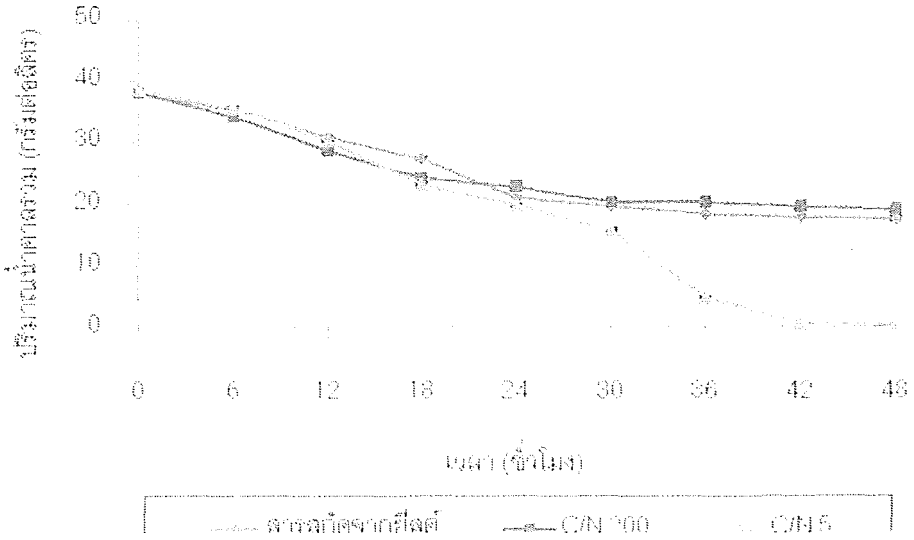
รูปที่ 15 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 15 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 มีแนวโน้มของการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง



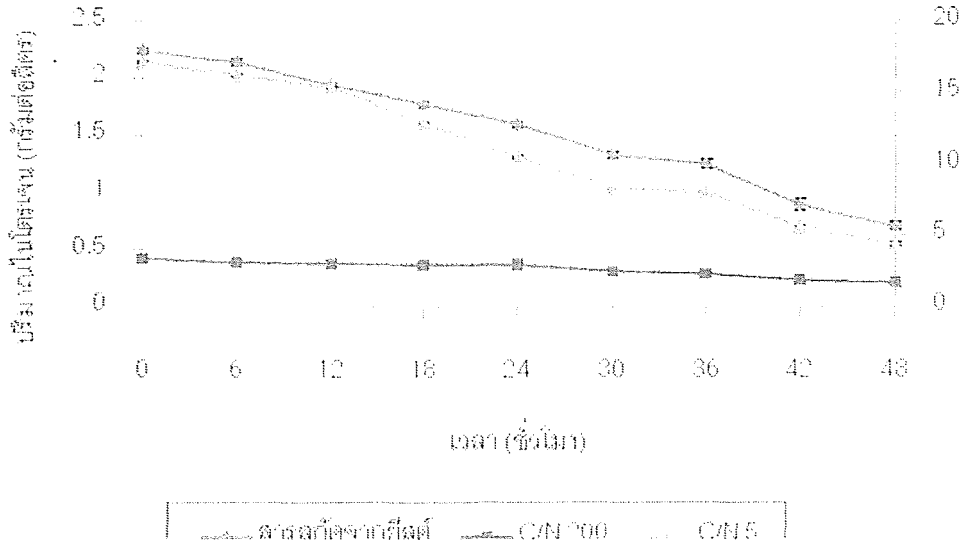
รูปที่ 16 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 16 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และในภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว พบว่าในภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวมีแนวโน้มของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 10.666 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48



รูปที่ 17 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากรูปที่ 17 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกๆ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 15 ที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในระยะดังกล่าว และหลังจากเข้าสู่ช่วง stationary phase ในภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว และภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 พบว่าน้ำตาลมีปริมาณค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 48 แต่ที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 เชื้อยังมีการใช้น้ำตาลจนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 และ 200 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 และ 200 และในภาวะที่ไม่มีการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 18

จากการศึกษาผลของการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 พบว่า ในภาวะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) และความสามารถในการผลิต (productivity) มากที่สุด คือ 0.5692 g-EPS/g-sugar และ0.444 g-EPS/l/h ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้การเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

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

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

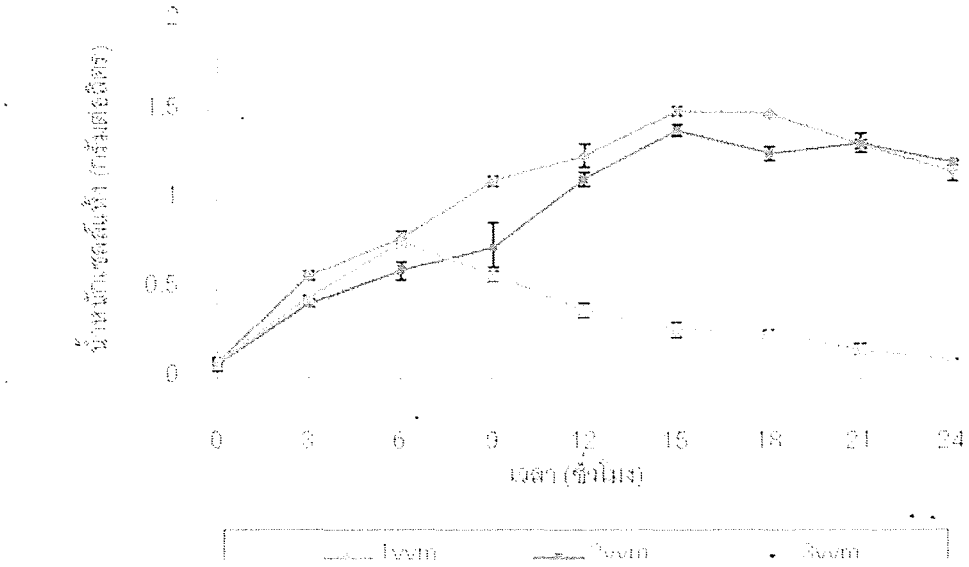
1.3.2 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนของใบพัด จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการศึกษาแหล่งของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว โดยใช้อัตราเร็วการกวนของใบพัด เท่ากับ 200 รอบต่อนาทีแล้วแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1 2 และ3 vvm ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณน้ำตาลรวม ได้ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 19-23 พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm มีอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 3 vvm มีการเจริญน้อยที่สุด โดยในชั่วโมงที่ 0-15 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณ ในระยะ log phase ดังแสดงในรูปที่ 19 และเมื่อพิจาณาน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 20) พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm ยังมีการเจริญของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 1.21 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm คือ 1.161 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราการให้อากาศที่ 3 vvm พบการเจริญน้อยที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร

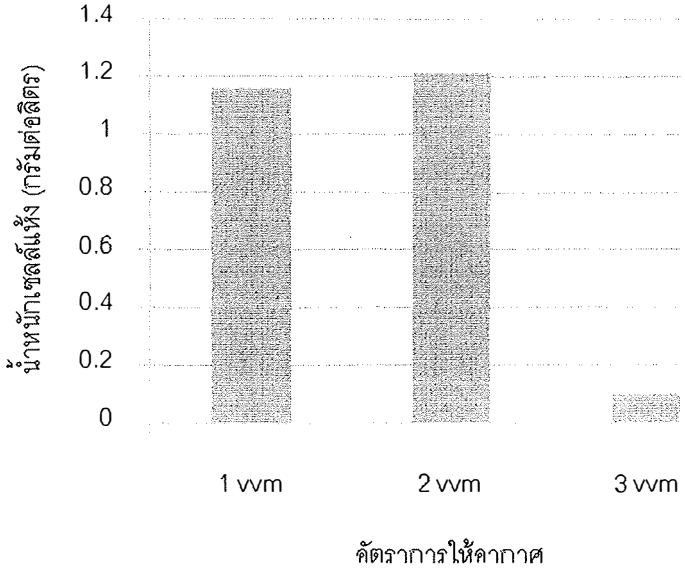
ดังรูปที่ 21 เมื่อพิจาณาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.78 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศที่ 2 vvm ส่วนที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 3 vvm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด เมื่อพิจารณาร่วมกับการผลิตการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 22) พบว่า อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm ยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.272 กรัมต่อลิตร ส่วนอัตราการให้อากาศที่ 3 vvm ผลิตได้น้อยที่สุด เท่ากับ 6.435 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรวม ในชั่วโมงที่ 0- 12 ชั่วโมง ของทุกอัตราการให้อากาศ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 19 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญแบบทวีคูณ และหลังจากการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 23

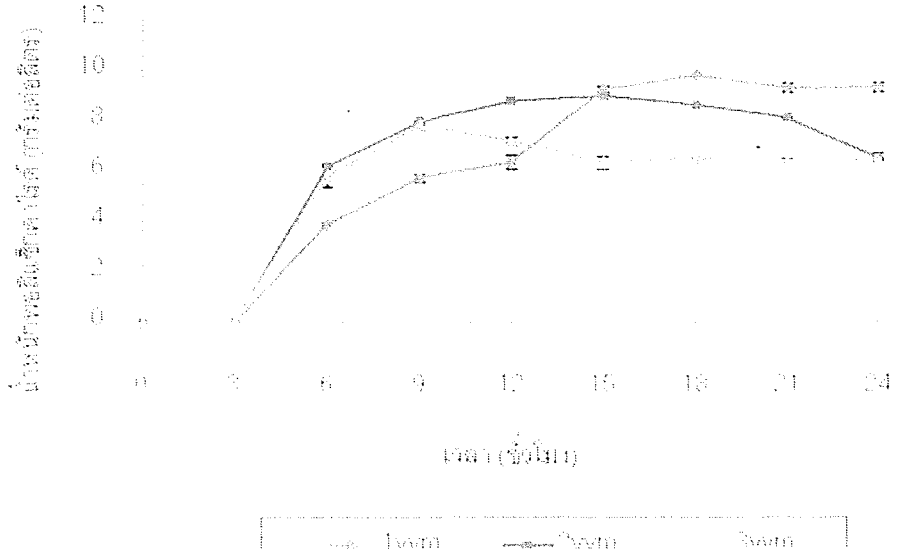
เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 24 ของแต่ละอัตราการให้อากาศ มาเปรียบเทียบกัน ร่วมกับค่าจลนพลศาสตร์ในตารางที่ 6 พบว่าอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด และเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm



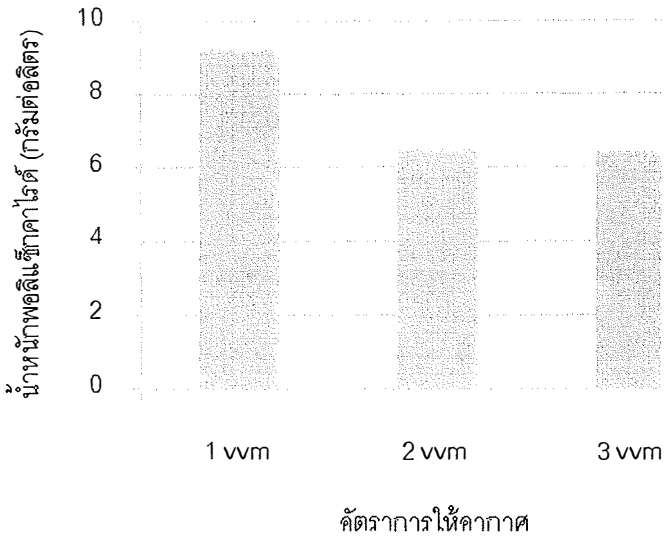
รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



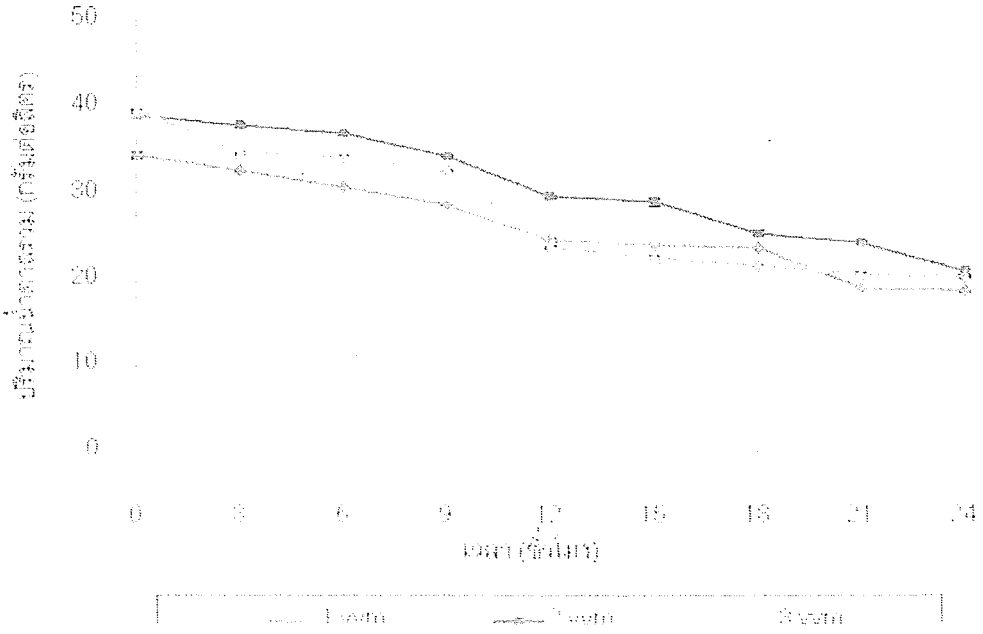
รูปที่ 20 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 21 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 22 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 23 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm ด้วยอัตราเร็วการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 2 และ 3 vvm

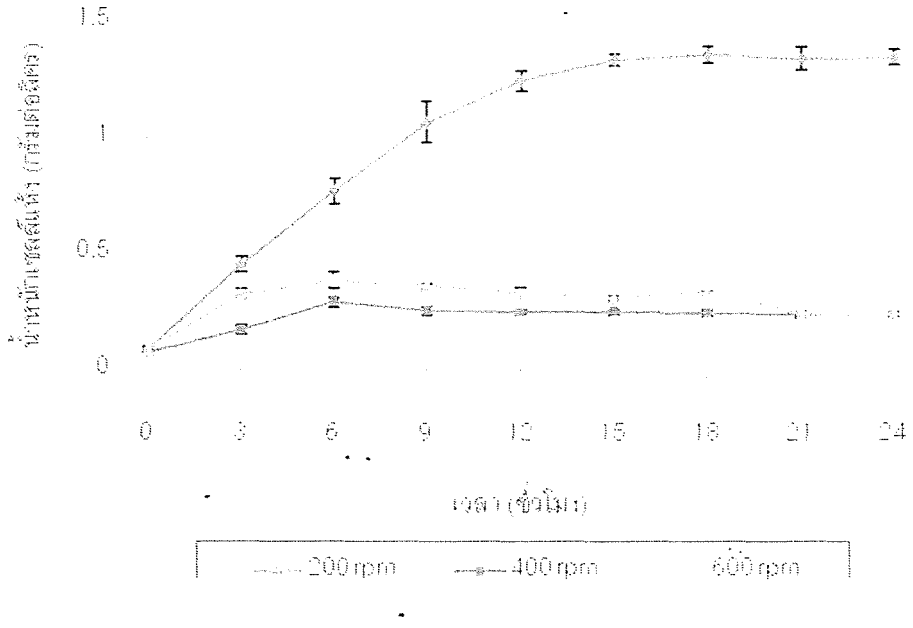
Kinetics parameters	1 vvm	2 vvm	3 vvm
μ, specific growth rate (h^{-1})	0.1561	0.1569	0.058
γ, specific consumption rate (g-sugar/g-CDW/h)	0.6777	0.854	2.2393
ρ, specific production rate (g-EPS/g-CDW/h)	0.4718	0.4993	0.9174
$Y_{x/s}$, cell yield coefficient (g-CDW/g-sugar)	0.1008	0.0873	0.0127
$Y_{p/s}$,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

1.3.3 ศึกษาอัตราเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

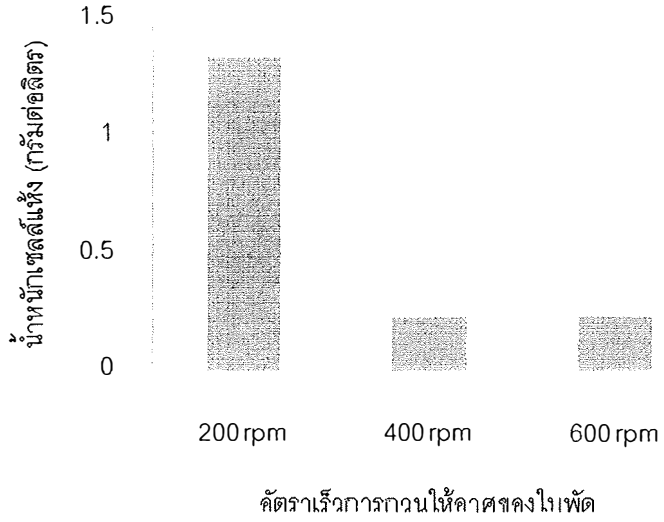
อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัด ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ การกวนยังทำให้จุลินทรีย์และสารอาหารที่ใช้ไม่ตกตะกอน เกิดการผสมและสัมผัสกันอย่างสม่ำเสมอ จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตร โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการศึกษาแหล่งของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว โดยมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm แล้วแปรผันอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเป็น 200 400 และ600 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณน้ำตาลรวม ได้ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 24-28 พบว่าอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm มีการเจริญของเชื้อสูงสุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 400 และ600 พบการเจริญที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 24) ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังรูปที่ 26 โดยพบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่อัตราเร็วการกวนใบพัดเท่ากับ 200 มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด และมีแนวโน้มของการผลิตเพิ่มสูงขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง ส่วนที่อัตราเร็วในการกวนใบพัดเท่ากับ 400และ 600 rpm มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราเร็วในการกวนใบพัดเท่ากับ 400 rpm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่า เมื่อพิจารณาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 27) พบว่า ที่อัตราเร็วการกวนใบพัดเท่ากับ 200 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 5.584 กรัมต่อลิตร และที่อัตราเร็วการกวนใบพัดเท่ากับ 600 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2.813 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรวม พบว่า ในช่วง 0-6 ชั่วโมง ของทุกอัตราเร็วการกวนใบพัดมีการลดลงของน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 24 ซึ่งมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในระยะ log phase และหลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase แล้ว ปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 28

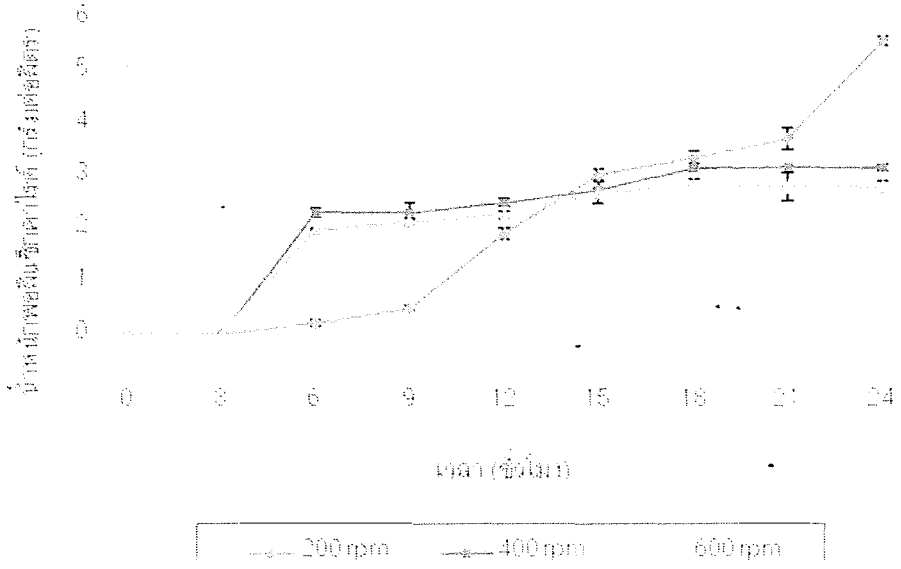
เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่ 24 ของแต่ละอัตราการให้อากาศ มาเปรียบเทียบกัน ร่วมกับค่าจลนพลศาสตร์ในตารางที่ 7 พบว่าอัตราการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200rpm สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด และเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้อัตราการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



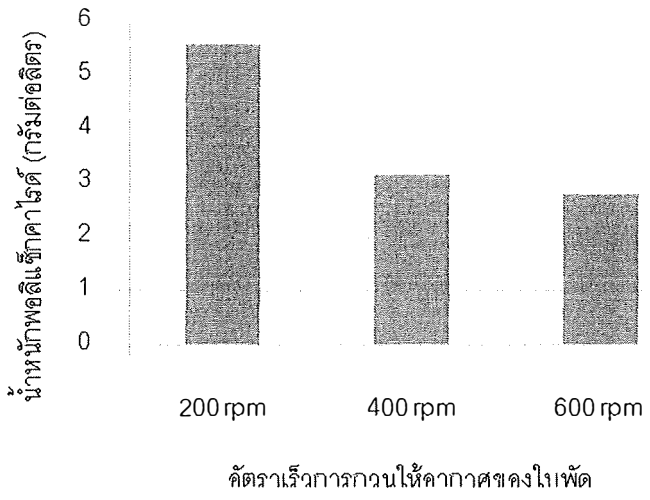
รูปที่ 24 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



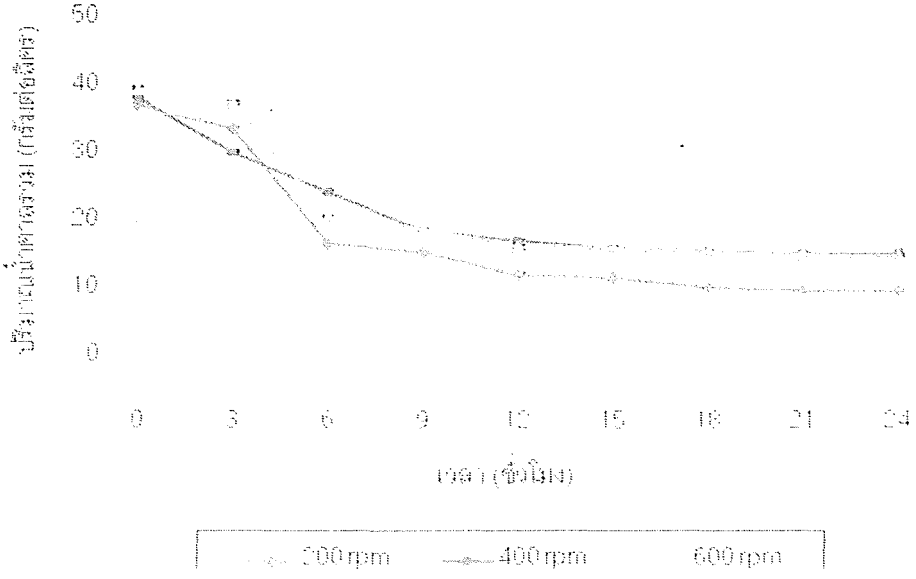
รูปที่ 25 เปรียบเทียบการเจริญของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง เชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 26 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 27 เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง



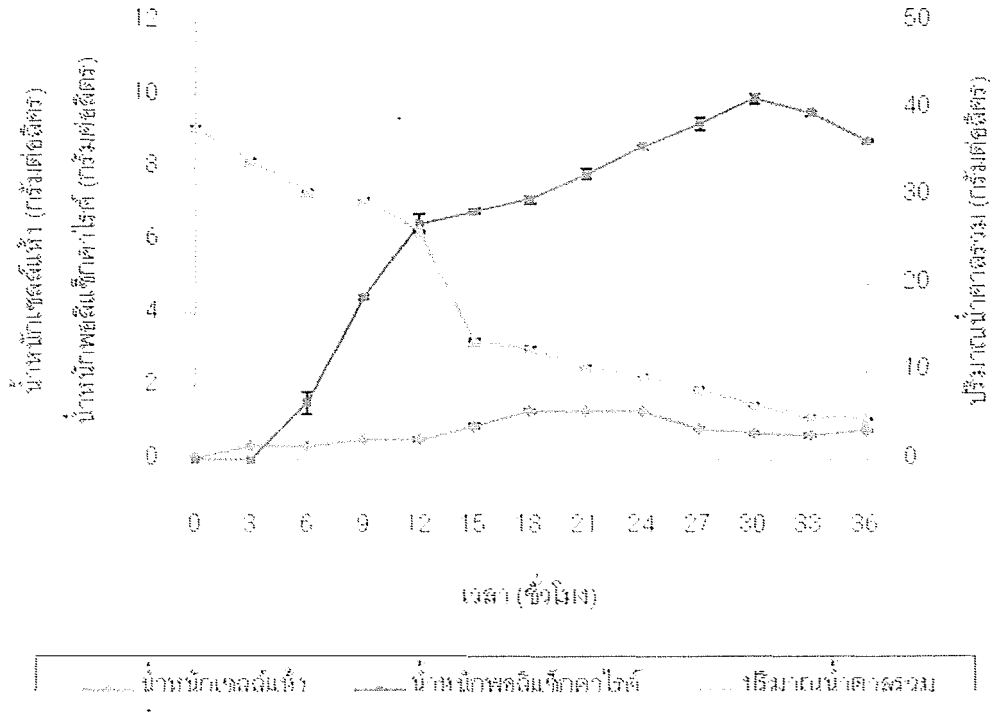
รูปที่ 28 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของแบคเรียสายพันธุ์ UV1-9 ระหว่างผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการแปรผันอัตราเร็วใบกวนที่ 200 400 และ 600 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 แสดงค่าจลนศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV-9 ในระดับถังหมัก เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราความเร็วในการกวนของใบพัดที่ 200 400 และ 600 rpm

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

3.3.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 % ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 1.4.2 บรรจุอยู่ ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวนที่ 200 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลรวม ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 29 พบว่าเชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 9.917 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อพิจาณาค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์(specific growth rate; μ)เท่ากับ 0.1605 h^{-1}, อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (specific consumption rate; γ) เท่ากับ 1.9214 g-sugar/g-CDW/h, อัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate; ρ)เท่ากับ 0.5896 g-EPS/g-CDW/h,ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.0453 g-CDW/g-sugar, ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.3060 g-EPS/g-sugar และความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.3305 g-EPS/l/h ในชั่วโมงที่ 30



รูปที่ 29 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm และอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดเท่ากับ 200 rpm

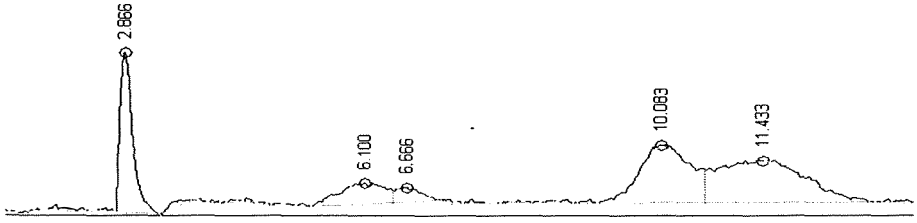
1.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

1.4.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

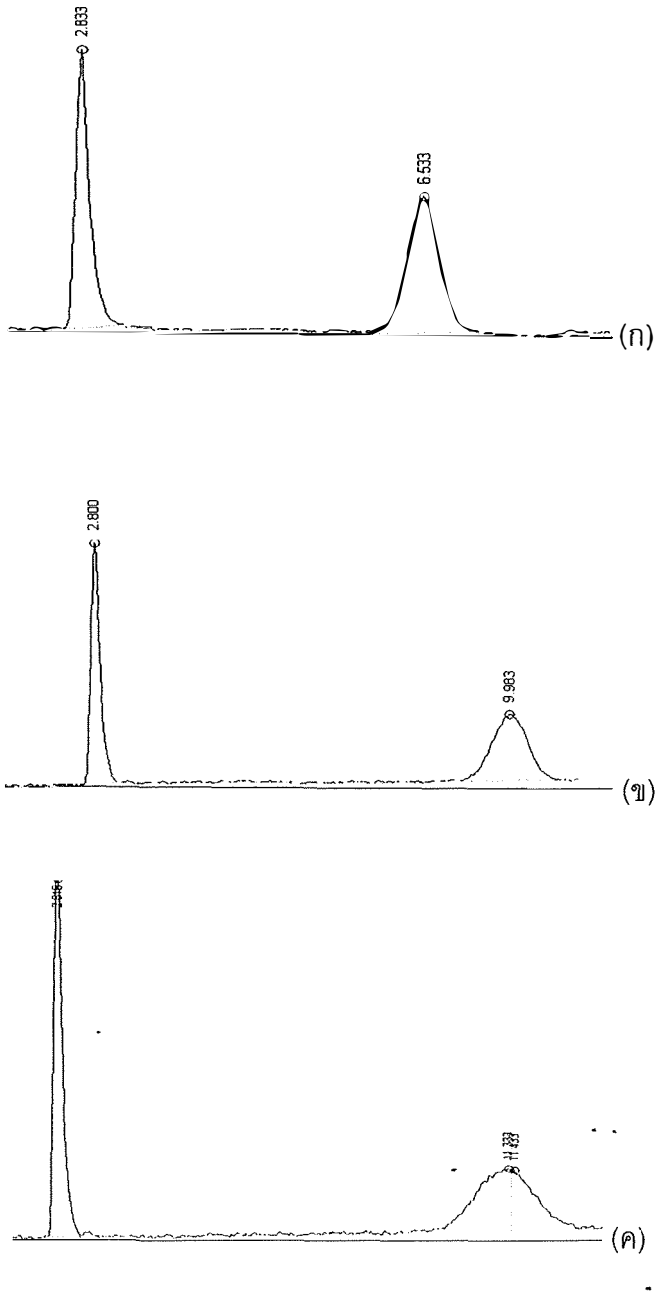
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ *Sugar SZ5532* ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors (วิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 30

ตารางที่ 8 ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

การผลิต	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
ระดับขวดเขย่า	กาแลคโทส กลูโคส และไซโลส
ระดับถังหมัก	กาแลคโทส กลูโคส และไซโลส



รูปที่ 30 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 31 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (ไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

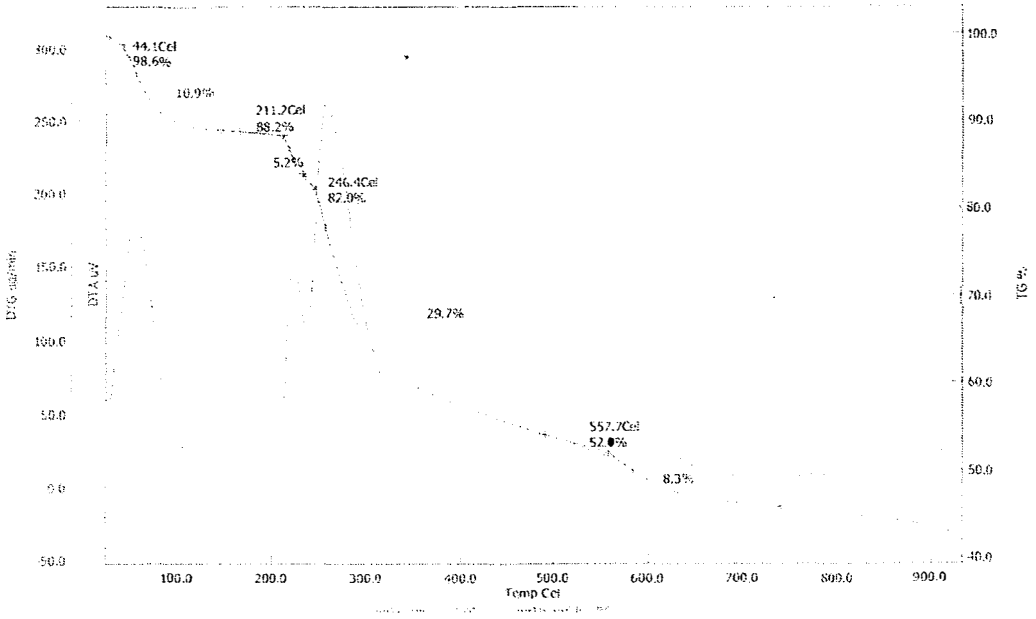
ก) สารละลายมาตรฐานน้ำตาลไซโลส
ข) สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส
ค) สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกาแลกโทส

1.4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ปริมาณ 20-25 มิลลิกรัมมาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Simultaneous Thermal Analyzer (STA) ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2004) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 รูปที่ 32 และรูปที่ 33

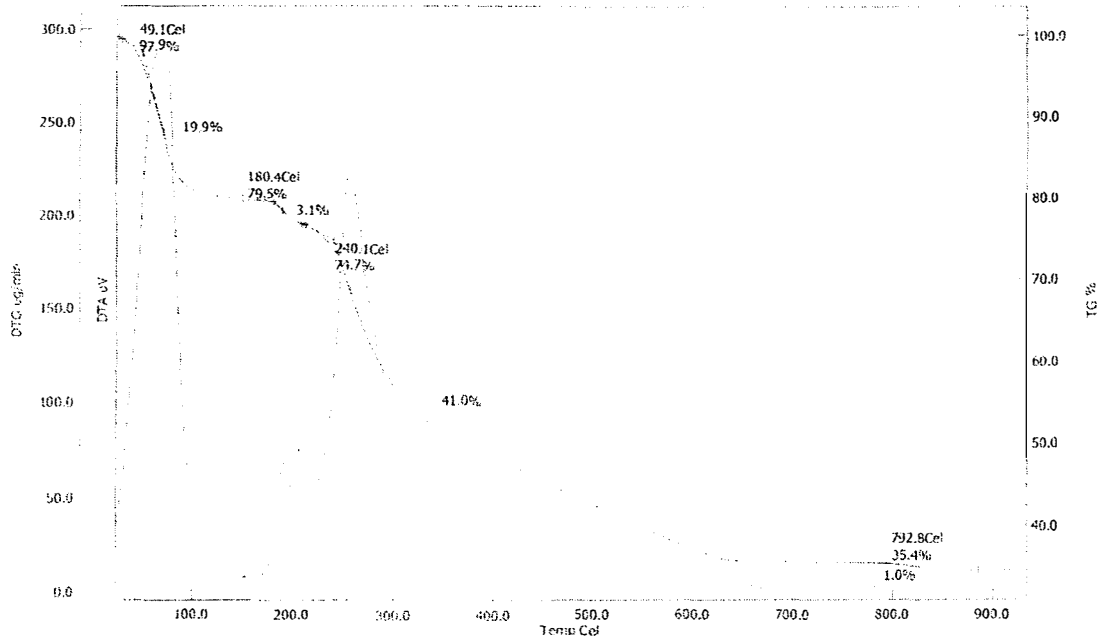
ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิการย่อยสลายที่จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9

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



รูปที่ 32 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 แสดงดังรูปที่ 32 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 4 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 30-150 องศาเซลเซียส มีการลดลงของน้ำหนัก 10.90% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีใน พอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียสจนถึง 250 องศาเซลเซียสและน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียสโดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5.20% กระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 260 – 490 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 29.70% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 4 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 560-730 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 4 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 8.3%



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. cloacae* สายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมักโดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 แสดงดังรูปที่ 33 มีขั้นตอนกระบวนการสลาย 4 ขั้นตอนเช่นกัน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 30-150 องศาเซลเซียสมีการลดลงของน้ำหนัก 19.90% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีใน พอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสจนถึง 210 องศาเซลเซียสและน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียสโดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 3.10% กระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 3 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 250 – 690 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 3 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 41.0% และกระบวนการสลายในขั้นตอนที่ 4 มีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 750-880 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 4 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 1.0%

1.4.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมงวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ต่อระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้หรือเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) (Tako และคณะ, 1982) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

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

จากตารางที่ 10 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 28.17 และ 25.60 % ตามลำดับ แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่าตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ ได้แก่ กัวกัม และคาราจีแนน ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการอุ้มน้ำของแซนแทนพบว่า แซนแทนมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูงกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ของสายพันธุ์ UV1-9 ทั้งจากการผลิตในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก

1.4.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้องจากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Collins และคณะ, 1973) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ทั้งจากการผลิตในระดับขวดเขย่า และระดับถังหมัก สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ให้ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความข้นหนืดเช่นเดียวกันกับแซนแทน

ตารางที่ 11 ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5%ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

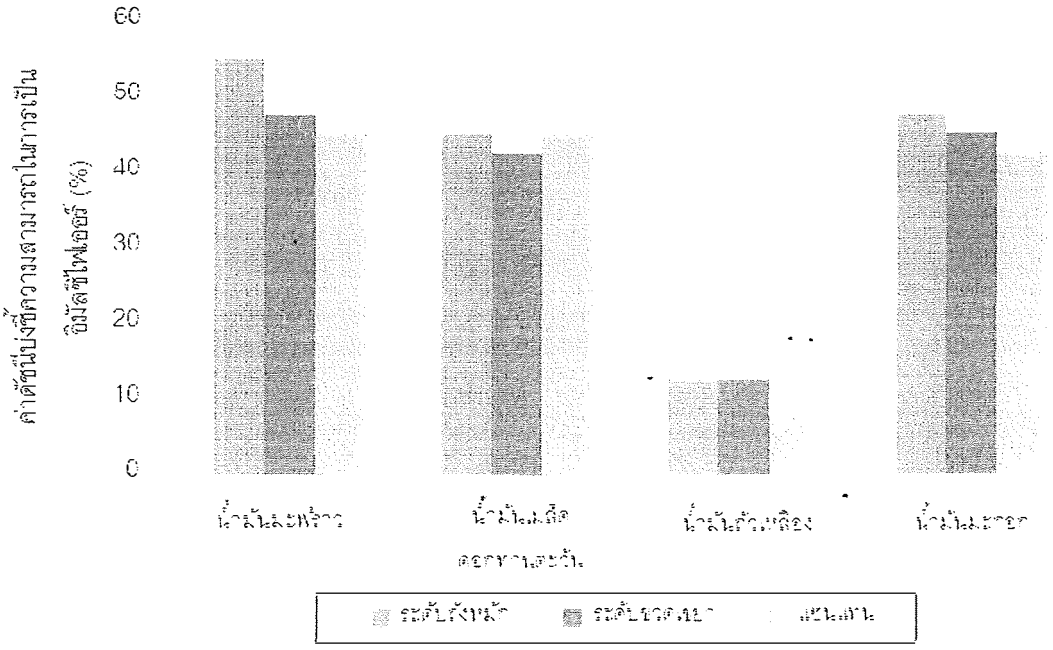
พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย	**ความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์**
UV1-9 (ในระดับขวดเขย่า)	ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด
UV1-9 (ในระดับถังหมัก)	ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด
แซนแทน	ละลายน้ำดีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีความข้นหนืด

1.4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาวัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifing activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัมและชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 34

ตารางที่ 12 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช ในอัตราส่วน 1:1

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

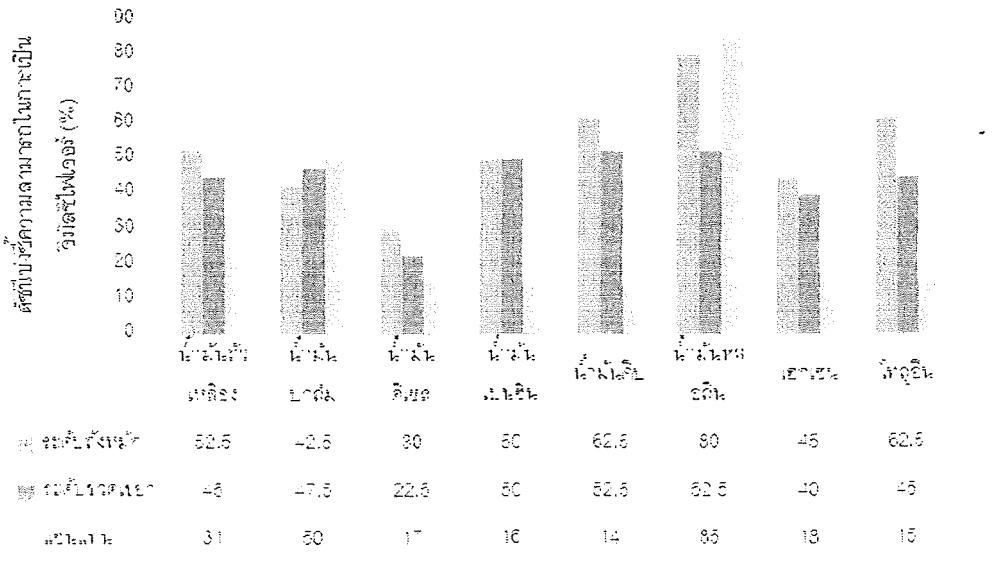


รูปที่ 34 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ

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

1.4.6 การศึกษาความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Cooper และGoldenberg, 1987)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันดีเซลน้ำมันดิบ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เบนซีน เฮกเซน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์จากระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟเออร์และคำนวณหา ค่าดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsification index (E_{24})) ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 35

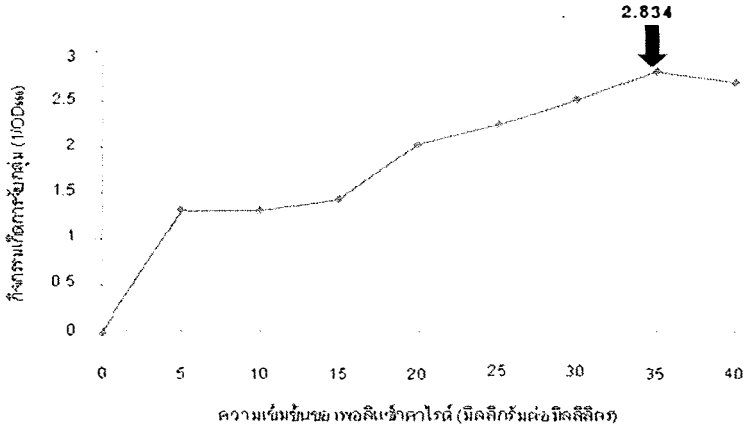


รูปที่ 35 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 กับน้ำมันจากพืชและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

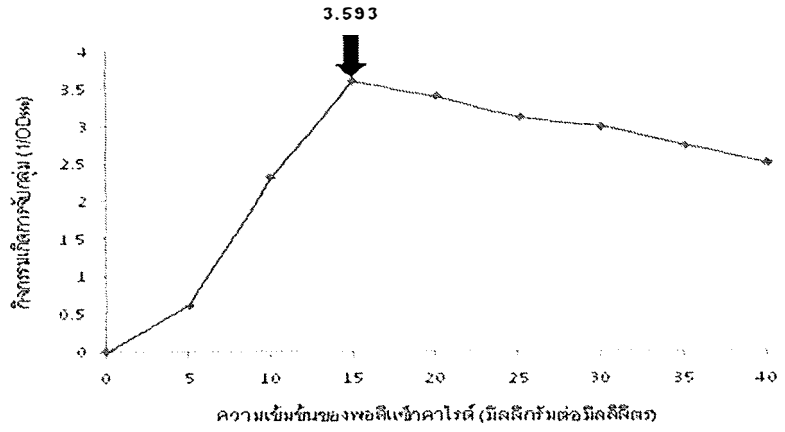
จากรูปที่ 35 แสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ที่ผลิตจากระดับถังหมักมีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันชนิดต่างๆ ได้ดีกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับขวดเขย่า โดยมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันจากพืช ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน น้ำมันดิบ เฮกเซน และโทลูอีนได้ดีกว่าแซนแทน โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันหล่อลื่นได้ดีที่สุด จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ไปประยุกต์ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อมได้

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

แปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 5 10 15 20 25 30 35 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากกนั้นนำมาวิเคราะห์และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) ได้ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 36 และ37 โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับถังหมักมีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และดีกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากระดับขวดเขย่า



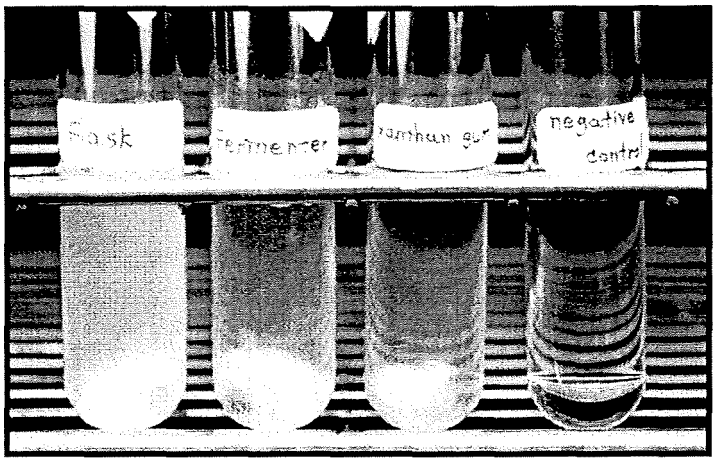
รูปที่ 36 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 37 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับถังหมัก ความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.4.8 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล เติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ จะทำให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง ได้ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 38 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีประจุลบ (Acidic polysaccharide)



(ก) (ข) (ค) (ง)

รูปที่ 38 ลักษณะตะกอนสีขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ ภายหลังการเติมสารละลาย Cetylpyridiniumchloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล

(ก) สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับขวดเขย่า

(ข) สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับถังหมัก

(ค) สารละลายแซนแทนกัม (ชุดควบคุมบวก)

(ง) สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมลบ)

1.4.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

1.4.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับขวดเขย่า และระดับถังหมักมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 85.3 และ 88% ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

การผลิต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)
ระดับขวดเขย่า	85.3
ระดับถังหมัก	88

1.4.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 จากระดับขวดเขย่า และระดับถังหมักมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 5.8 และ 3.6% ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้แบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9

การผลิต	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ (%)
ระดับขวดเขย่า	5.8
ระดับถังหมัก	3.6

1.4.10 การวัดความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นนำมาวัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Viscometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mata และคณะ, 2008) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มีค่าความหนืดน้อยกว่าแซนแทนซึ่งผลิตใช้ในอุตสาหกรรม

ตารางที่ 15 ค่าความหนืดของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก

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

2. การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

2.1 การตรวจประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้

คัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมัก ได้แก่ ผักกาดดอง 5 ตัวอย่าง หน่อไม้ดอง 6 ตัวอย่าง และ มะนาวดอง 1 ตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม ชลบุรี และอุดรธานี แล้วคัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียและดูการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า พบแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้จาก ตัวอย่างหน่อไม้ดอง ที่เก็บมาจากจังหวัดนครปฐม โดยแลคติดแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้นั้นสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 8 สายพันธุ์ ให้รหัสเป็น L01 L02 L03 L04 L05 L06 L07 และ L08 โดยลักษณะโคโลนีที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์แสดงดังในตารางที่ 16 และ รูปที่ 39

ตารางที่ 16 ลักษณะโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่คัดแยกได้จากหน่อไม้ดองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

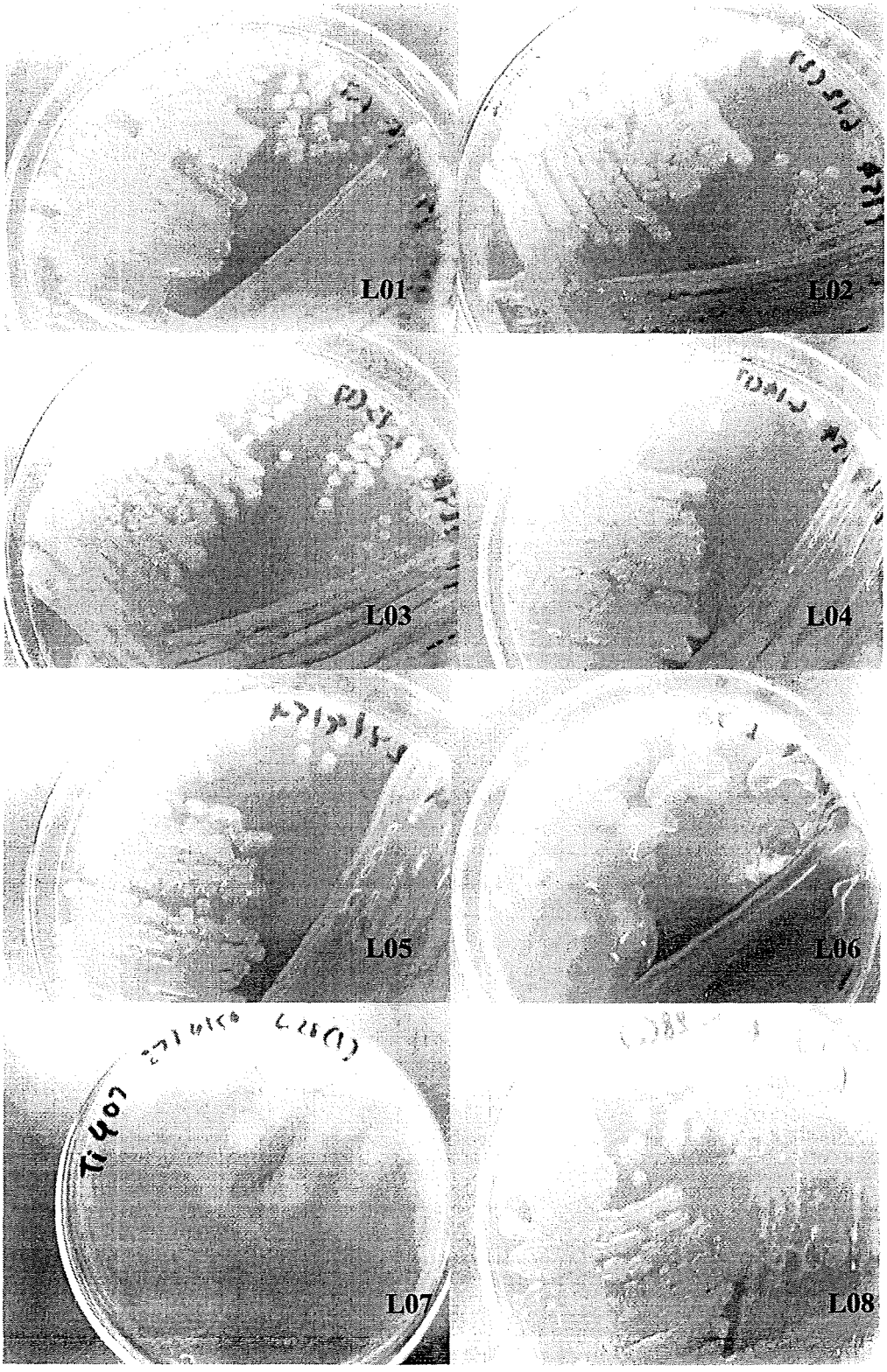
รหัสเชื้อ	**ความกว้างของโคโลนีลักษณะเมือก** (cm)
L01	+
L02	+
L03	+
L04	+
L05	+
L06	+++
L07	+++
L08	+

หมายเหตุ : ความกว้างของโคโลนีแทนด้วยเครื่องหมาย (+) ที่วัดได้

+ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.0 มิลลิเมตร

++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่า 5.0 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 10.0 มิลลิเมตร

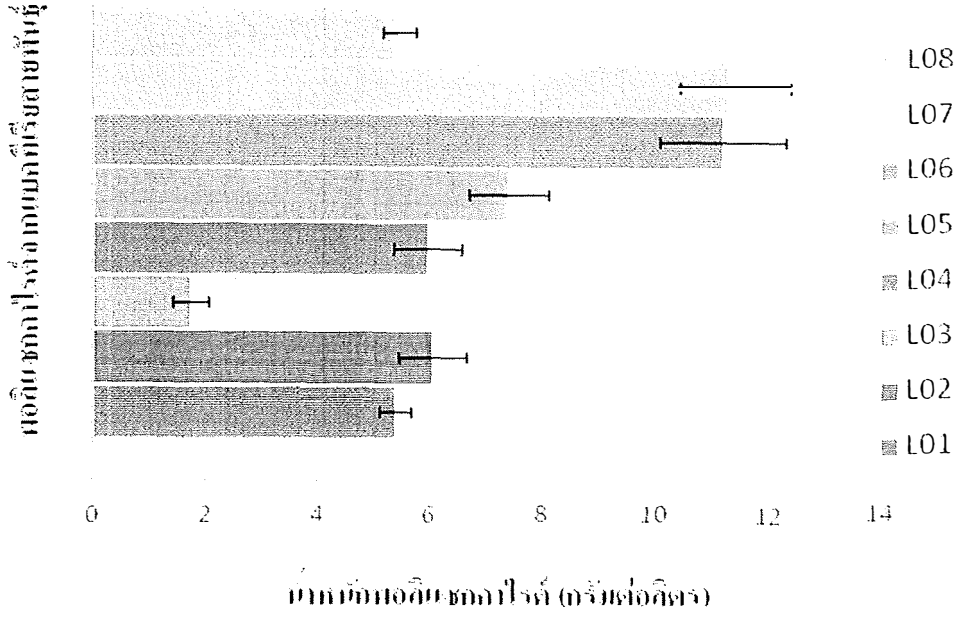
+++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าหรือเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตร



รูปที่ 39 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเศลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซกคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)
L01	5.40 ± 0.28
L02	6.05 ± 0.60
L03	1.73 ± 0.32
L04	5.97 ± 0.60
L05	7.41± 0.70
L06	11.20 ± 1.11
L07	11.40 ± 0.98
L08	5.45 ± 0.29



รูปที่ 40 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่ 30 องศา เป็นเวลา 24 ชม.

จากตารางที่ 17 และรูปที่ 40 พบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L03 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด เท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01 L02 L04 L05 และ L08 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปานกลางในช่วง 5.40 – 7.41 กรัมต่อลิตร และแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด ได้แก่ สายพันธุ์ L06 และ L07 ซึ่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

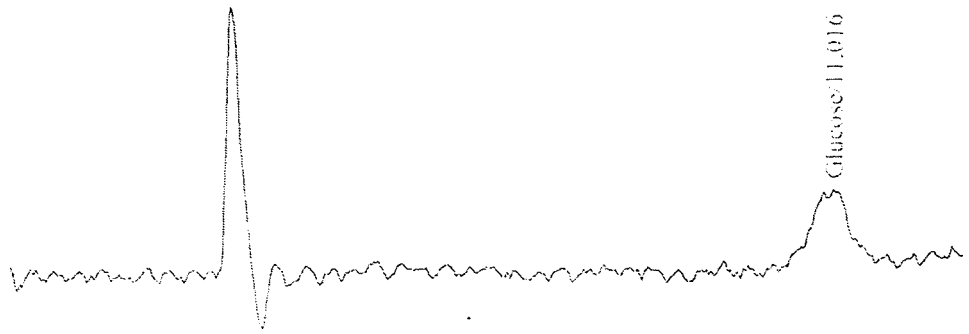
2.2.1 วิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01 – L08 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 กรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตามวิธี 2.4.1.2 โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ ส่วนประกอบชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 แสดงดังในตารางที่ 18

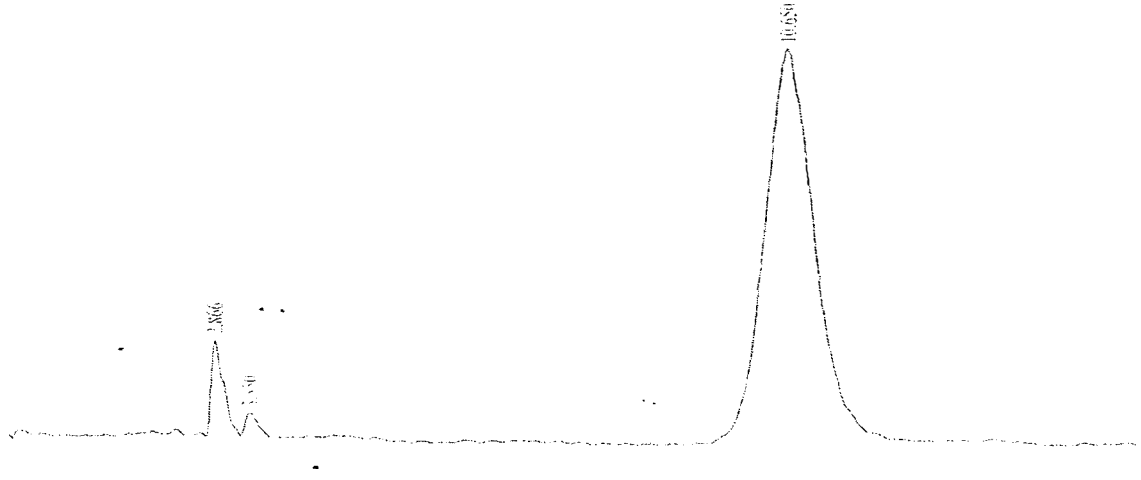
ตารางที่ 18 แสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 หลังจากย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลาย 80% โดยปริมาตรอะซิโตรไทร์ลเป็นตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
L01	กลูโคส
L02	กลูโคส
L03	กลูโคส
L04	กลูโคส
L05	กลูโคส
L06	กลูโคส
L07	กลูโคส
L08	กลูโคส

แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมที่แสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L06 โดยเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 41



(ก)



(ข)

รูปที่ 41 โครมาโทแกรมแสดง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ข) ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ L06 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากตารางที่ 18 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ L01 – L08 เป็นชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเรียกว่า กลูแคน (Monsan และคณะ, 2001) จากการรายงานก่อนหน้าพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคสที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะอยู่ในสกุล *Leuconostoc*, *Lactobaciilus* และ *Weisella* (Korakli และคณะ, 2011)

2.2.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

2.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 19

2.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976) ผลของปริมาณโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ (%)	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ (%)
L01	99.61	5.38
L02	77.61	8.88
L03	81.83	8.63
L04	71.83	8.63
L05	65.06	9.88
L06	73.39	5.63
L07	88.61	6.88
L08	77.61	8.63

2.2.3 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01 – L08 ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ที่อุณหภูมิห้อง และเปรียบเทียบความสามารถในการละลายกับแซนแทนกัม ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ในแต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ อุณหภูมิห้อง		
	น้ำกลั่น	เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล	ลักษณะความหนืด
L01	++	-	ความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัม
L02	++	-	
L03	++	-	
L04	++	-	
L05	++	-	
L06	++	-	
L07	+++	-	
L08	++	-	
แซนแทนกัม	+++	-	ความหนืดสูง

หมายเหตุ : ความสามารถการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์แทนด้วยเครื่องหมาย (+)

- ไม่ละลาย เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด
- \+ ละลายได้ต่ำ (ละลายได้เล็กน้อย ยังมีตะกอนอยู่มาก)
- ++ ละลายได้ปานกลาง (ละลายได้บางส่วน ยังมีตะกอนอยู่)
- +++ ละลายได้ดี (ละลายได้หมด)

จากตารางที่ 20 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01 L02 L03 L04 L05 L06 และ L08 ละลายในน้ำกลั่นได้ปานกลาง ยกเว้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L07 ละลายได้ดีในน้ำกลั่น และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่ละลายในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล และมีความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัม

2.2.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำ

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ โดยจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำเหมือนข้างต้นโดยจุ่มในน้ำกลั่นอีกหนึ่งชุด จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) หากเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำจะ แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง ผลของการทดสอบแสดงดังในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	**เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์**
L01	71.41 ± 0.085 %
L02	73.82 ± 0.054 %
L03	68.30 ± 0.099 %
L04	67.62 ± 0.032 %
L05	82.85 ± 0.13 %
L06	87.29 ± 0.079 %
L07	80.91 ± 0.090 %
L08	73.26 ± 0.028 %
แซนแทนกัม	9.15 ± 0.0032 %
คาราจีแนน	46.14 ± 0.051 %
กัวร์กัม	35.73 ± 0.034 %

จากตารางที่ 21 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์สูง แสดงว่า มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ และมีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำกว่าแซนแทนกัม คาราจีแนน และกัวร์กัมที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า

2.2.5 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 ตามวิธีการทดลองข้อ 2.4.5 แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ L01-L08 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กับน้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	Emulsifying activity (%) **ที่ความเข้มข้น** 0.1%	
	น้ำมันถั่วเหลือง	**น้ำมันมะกอก**
L01	46.98±0.005	47.22±0.005
L02	46.16±0.018	48.47±0.018
L03	46.66±0.027	49.26±0.017
L04	46.51±0.002	48.48±0.007
L05	47.60±0.011	48.37±0.014
L06	46.88±0.011	47.63±0.012
L07	46.06±0.009	48.85±0.001
L08	46.56±0.019	48.52±0.017
แซนแทนกัม	46.67±0.00	48.25±0.043

จากตารางที่ 22 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์มีค่า Emulsifying activity ที่ใกล้เคียงกันทั้งในน้ำมันถั่วเหลือง และ น้ำมันมะกอก และยังมีค่าใกล้เคียงกับแซนแทนกัม แสดงว่ามีความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลงานวิจัยในปีที่ 4 จากการทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ได้สูงขึ้น โดยทำการกลายพันธุ์แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณมากที่สุด คือ สูงกว่าสายพันธุ์ดังเดิมถึง 12 เท่า จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ UV1-9 มาเพิ่มขนาดการเลี้ยงในกระบวนการหมักแบบแบตช์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวสูตรปรับปรุงซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ภายใต้ภาวะการผลิตที่ควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราเร็วใบกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 9.917 กรัมต่อลิตร ในเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าถึง 9 เท่า โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (μ) เท่ากับ 0.1605 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการใช้น้ำตาลซูโครสจำเพาะ (γ) เท่ากับ 1.9214 กรัมซูโครสต่อลิตรชั่วโมง อัตราการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะ (ρ) เท่ากับ 0.5896 กรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรชั่วโมง ปริมาณของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.0453 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.3060 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีความสามารถในการผลิตเท่ากับ 0.3305 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ พบว่า เป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลกาแลคโทส และไซโลสเพียงเล็กน้อย มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้องและมีความหนืดสูง นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่อน้ำมันจากพืชและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เท่ากับ 88 % และ 3.6% ตามลำดับ

การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักพบว่าสามารถแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากหน่อไม้ดองได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ คือ L01 L02 L03 L04 L05 L06 L07 และ L08 โดยสายพันธ์สายพันธุ์ L06 และ L07 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เท่ากับ 11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ องค์ประกอบน้ำตาลเชิงเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจัดว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์

ทั้งหมด มีความสามารถในการก่ออิมัลชั่นได้ดี และแลคติกแอสิดแบคทีเรียยังจัดอยู่ใน GRAS ซึ่ง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย

รายการอ้างอิง

จันทร์จนา ตันสกุล. 2539. **การคัดเลือกเชื้อและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพร ชาติวรพงศา. 2536. **การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย** *Penicillium* sp. **สายพันธุ์** 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Ashiuchi, M., Shimanouchi, K., Nakamura, H., Kamei, T., Soda, K., Park, C., Sung, M. H. and Misono, H. 2004. Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly gamma-glutamate and regulation of its stereochemistry. **Appl Environ Microbiol**. 70(7): 4249-55.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-binding. **Anal Biochem**. 72, 248-254.

Bromfield, S. M. 1954. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. **Gen Microbiol**. 11:1-6.

Calazans GMT, L. C., Lima RMOC, de Franc FP. 1997. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnol Lett**. 19: 19-21.

Collins, E.A., Bares, J. and Billmeyer, F.W. 1973. **Experiments in Polymer Science**, Wiley, New York.

Dekker, R. F. H. and Wallis, A. F. A. 1983. Enzymic saccharification of sugarcane Bagasse Pretreated by Autohydrolysis-Stream Explosion. **Biotech Bioeng**. 25:3027-3048.

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

Harada, T. 1977. **Production, properties, and application of curdlan**. Washington.

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.

Korakli, M., Vogel, R.F. 2006. Structure/function relationship of hompolysaccharides producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesized glycans. **Appl Microbiol Biotechnol,** 71, 790–803.

Kumar, C.G., Joo, H.S., Choi, J.W., Koo, Y.M., Chang, C.S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophillus *Baciilus* sp. I-450. **Enz Microb Technol**. 34: 673-68

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.

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

Margaritis, A. and Pace, P. W. 1985. Microbial polysaccharide. **In Moo Young, M. (ed.), Comprehensive Biotechnology**. vol. 3.

Mata, J. A., Bejar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C. and Quesada, E. 2007. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. **J Appl Microbiol**. 105: 521-528.

Mitchell, J. R. 1979. **Rheology of polysaccharide solution and gel**. London.

Morin, A. 1998. Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production, and recovery of microbial polysaccharides. **In Polysaccharides**. 275-296.

Monsan, P.F., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M., and Remaud-Simeon, M. 2011.Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**,11, 675–685

Parisi, F. 1989. **Advance in Lignocellulosic Hydrolysis and in the Utilization of Hydrolysates**. In Fiechter A. (ed.), Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, vol.38, Springer-Verlag Berlin Heidelberg : New York.

Paturua, J.M. 1989. **Bagasse, By-Products of the cane sugar industry**. Elsevier Science Publisher, vol.11. Third edition.

Paul, A. S. 1979. **A survey of possible new polysaccharides**. London.

Ruas-Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilan, C.G. 2005. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by

lactic acid bacteria. **Journal of dairy science** 88 : 843-856.

Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G. and Chang, Y. N. 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. **Bioresour Technol.** 78(3): 267-72.

Stauffer, K. R. and Leeder., J. G. 1978. Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey. **J Food Sci.** 43: 756-758.

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. **Appl Environ Microbiol.** 65: 862–864.

Virkola, N. E. 1975. **Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose.** p.23. In Bailey, M. Enari, T. M. and Linko, M., eds., SITRA, Aulanko, Finland.

Whistler, R. L. 1993. Introduction to industrial gums. **Industrial gums polysaccharides and their derivatives**. R. L. Whistler and J. N. B. Miller. San Diego, Academy Press, Inc.: 1-19.

Whistler, R. L. and Miller, J. N. B. 1993. Introduction to polysaccharides. **Industrial gums polysaccharides and their derivatives.** California, Academic Press.

Yalpani, M. 1987. **Industrial polysaccharides : genetic engineering, structure/property relations and applications.** Amsterdam, Elsevier Science.

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

ภาคผนวก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani(LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำหลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่ออารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร** Bromfield-finland

น้ำตาลซูโครส	40.0	กรัม
แมกนีเซียมแฮกซะไฮเดรต	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำหลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งดัดแปลงจากอาหารสูตร** Bromfield-finland

เตรียมอาหารด้วยวธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield-finland แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** 2YT (2YT broth) (Sambrook และ Russell, 2001)

ทริปโตน	16.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	10:0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

6. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** MRS

โปรตีเอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	22.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมซิเตรท	1.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.089	กรัม
ทวีน 80	1.0	มิลลิลิตร

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 6.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7. **อาหารเหลวกำหนดสูตร**

กลูโคส	30.0	กรัม
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	30.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	กรัม
KH_2PO_4	0.1	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำหลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

ประวัตินักวิจัย

ชื่อผู้วิจัย	นายสุเทพ ธนียวัน
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์	02-218-5070
โทรสาร	02-252-7576
e-mail	tsuthep@chula.ac.th

ชื่อผู้วิจัย	นางจิราภรณ์ ธนียวัน
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์	02-218-5070
โทรสาร	02-252-7576
e-mail	jiraporn.Th@chula.ac.th

ชื่อผู้วิจัย	นางสุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์	02-218-5070
โทรสาร	02-252-7576
e-mail	suchada.cha@chula.ac.th

ชื่อผู้วิจัย	นางสาวปาหนัน เริงสำราญ
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์	02-218-5070
โทรสาร	02-252-7576
e-mail	panan.r@chula.ac.th

สรุปผลงานตั้งแต่ปี 2550-2554 (ปีที่ 1-4)

โครงการย่อยที่

ชื่อโครงการ การผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร
(Production of Microbial Polymer for the Application in Food Industry)

ชื่อหัวหน้าโครงการ รองศาตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน

1. การเผยแพร่ผลงานในการประชุม

1.1 ระดับชาติ -

1.2 ระดับนานาชาติ

ชื่อการประชุม	สถานที่	เรื่อง	วัน/เดือน/ปี
PACCON2012 "Chemistry Beyond Boundaries"	The Empress Hotel Chiang Mai, Chiang Mai, Thailand	Isolation and characterization of exopolysaccharide producing-lactic acid bacteria from thai fermented vegetables	January 11-13, 2012
The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology TSB 2010 "International Conference on Biotechnology for Healthy Living"	Prince of Songkla University, Trang Campus, Trang, Thailand	Exopolysaccharide-producing *Enterobacter cloacae* mutants strain UV1-9 and the chemical physical characterizations of its product	October 20-23, 2010
PACCON2010 "Challenges in Chemistry for	Sunee Grand Hotel and Convention Center,	High exopolysaccharide-producing mutants	January 21-23, 2010

Sustainable Development"	Ubonratchathani, Thailand	of bacteria strain EN02	
The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009 "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"	Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand	Isolation and characterization of exopolysaccharide from bacteria	September 24-25, 2009
The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009 "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"	Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand	Polymer production from bacteria and chemical and physical properties thereof	September 24-25, 2009
The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009	Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand	Isolation of biopolymer-producing bacteria and characterization of the biopolymer	September 24-25, 2009

"Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"			

2. การสาธิตและการถ่ายทอดเทคโนโลยี -

3. สิทธิบัตร

   3.1 ระดับชาติ -

   3.2 ระดับนานาชาติ -

4. การเผยแพร่ผลงานในวารสาร

   4.1 ระดับชาติ -

   4.2 ระดับนานาชาติ -

5. Test kit/ต้นแบบ -

6. การนำไปใช้ประโยชน์เชิงชุมชน -

7. นิสิตที่สำเร็จการศึกษาภายใต้โครงการ แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างทางเศรษฐกิจยุคใหม่

ระดับ	ชื่อ-นามสกุล
ปริญญาตรี	1. น.ส.สุกัญญา เกรียงไกรเดช 2. นายเอนกพงศ์ จิตรเลิศปัญา 3. น.ส.ธัชอนงค์ แจ่มสวัสดิ์
ปริญญาโท	1. น.ส.วิชชุดา วิไลรัศมี (กำลังศึกษาอยู่) 2. น.ส.สุกัญญา เกิดสุข 3. น.ส.วรรษมน นิลสันเทียะ 4. น.ส.ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์ 5. น.ส.พนิดา เทียมชัยบุตร 6. น.ส.สายทิพย์ เรืองมา 7. น.ส.สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์
ปริญญาเอก	-ไม่มี-