การคัดเลือกและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

นางสาววรรษมน นิลสันเทียะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA

Miss Watsamon Nilsantia

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย
โดย	นางสาววรรษมน นิลสันเทียะ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

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

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

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

วรรษมน นิลสันเทียะ : การคัดเลือกและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (SELECTION AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 145 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตมีทั้งที่เป็นชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ และฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถละลายน้ำได้ดี ให้ความหนืดต่ำ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากกลุ่ม EN และ EP มีความสามารถในการอุ้มน้ำและการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB ขณะที่กลุ่ม LAB มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า และมีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่ากลุ่ม EN และ EP 4-5 เท่า จากการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่า กลุ่มที่มีรหัส EN และ EP เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ขณะที่กลุ่ม LAB เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรียซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค จึงคัดเลือกกลุ่ม LAB มาศึกษาสมบัติเพิ่มเติม พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก LAB1 LAB2 และ LAB3 มีประจุเป็นกลาง มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์และเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ แต่ไม่มีความสามารถในการเกิดเจล โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติที่ดีกว่าที่เหลือจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธานซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรีย *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) จากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ LAB1 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงใหม่ ที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 5.0% และอัตราส่วน Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract มีค่าเท่ากับ 0.5 : 0.5 : 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ภายใต้ภาวะที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

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

ปีการศึกษา..2553…….....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072449423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES / CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS

WATSAMON NILSANTIA : SELECTION AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA. ADVISOR : ASSOC.PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D.,145 pp.

In the present study, characterization of exopolysaccharides (EPSs) from bacteria strain EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 and LAB3 were performed. Polysaccharides from these strains were of either heteropolysaccharide or homopolysaccharide in nature with good water solubility and low viscosity. Polysaccharides from EN and EP groups have higher water holding and emulsifying activities than LABs. However, LAB group is more stable at high temperature and gave EPSs yield of 4-5 times that of EN and EP. Morphological characteristics and biochemical studies revealed EN and EP groups as *Enterobacteriaceae* and LAB as Lactic acid bacteria, a non-pathogenic organism. Further study and analysis of LAB polysaccharides showed that those from strains LAB1 LAB2 and LAB3 displayed a neutral characteristic, able to use as either stabilizer or flocculant while unable to use as gelling agent with LAB1's polysaccharide showed superior characteristics as compare to that of LAB2 and LAB3. Based on above result, strain LAB1 was selected for further study. Taxonomic studies and 16SrDNA analysis classified strain LAB1 as member of *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*). When grew in the modified MRS medium consist of 5% (w/v) sucrose, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) proteose peptone and 1% beef extract at optimum conditions of initial pH at 6.0 , at 200 rpm, 30°C for 18 hours strain LAB1 was able to produced the polysaccharide at 13.78 mg/ml.

Department : .....Microbiology…….....Student's Signature.....
Field of Study : .....Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....
Academic Year : ..2010…….....Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัญ ผลประไพ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

ขอขอบคุณพี่ณฤดี อัศวเสรีเลิศ พี่นฤมล นันทกิจโกศล คุณสุกัญญา เกิดสุข คุณนิโรบล เหลากลม คุณรพี สินเนืองนอง คุณกังสดาล ทองดอนง้าว คุณรุ่งตระการ จันทนพันธ์ และผองเพื่อนที่คอยให้คำปรึกษา-แนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ห้อง 407 และ 448 ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย และทำให้มีช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาคจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว และคุณธนะเทพ แจ่มวงษ์ ที่สนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆด้าน และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์..... 4

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์..... 6

2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย..... 16

2.4 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม..... 23

2.5 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์..... 25

2.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 29

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 32

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 32

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 33

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 35

3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 35

บทที่ หน้า

3.3.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่เลือกจากธรรมชาติ..... 37
3.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์..... 39
3.3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย..... 42
3.3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่เหมาะสมเบื้องต้น..... 45
3.3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..... 45
3.3.7 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในอุตสาหกรรม..... 47
3.3.8 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน..... 47
3.3.9 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..... 50
3.3.10 การศึกษารูปแบบการเจริญในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่..... 53

4. ผลการทดลอง..... 54
4.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติและคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 54
4.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์..... 58
4.2.1 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์..... 58
4.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส..... 60
4.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography..... 66
4.2.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย..... 67
4.2.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์..... 68
4.2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์..... 70
4.2.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์..... 70

บทที่ หน้า

4.2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ
พอลิแซ็กคาไรด์..... 70
4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และทดสอบลักษณะทางชีวเคมี
บางประการ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย……..…….. 71
4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา……..……. 71
4.4.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น..... 72
4.4 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่เหมาะสมเบื้องต้น……. 76
4.5 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มแบคทีเรีย
ที่คัดเลือกได้…… 78
4.5.1 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์…… 78
4.5.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์…… 79
4.5.3 การทดสอบความสามารถการเกิดเจล…… 81
4.5.4 ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์…… 81
4.6 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในอุตสาหกรรม……..... 83
4.7 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน..... 85
4.7.1 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้……... 85
4.7.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA…… 87
4.8 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อ 90
การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้……...
4.8.1 องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม…….. 90
4.8.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม…….. 90
4.8.1.2 ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม…… 91
4.8.1.3 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม…….. 92
4.8.2 ภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์…….. 95
4.8.2.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม…….. 95
4.8.2.2 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม…….. 96
4.8.2.3 ศึกษาการเขย่าและไม่เขย่า…….. 97
4.9 การศึกษารูปแบบการเจริญในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่……. 98

บทที่ หน้า

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 100

รายการอ้างอิง..... 114

ภาคผนวก..... 132

ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 133

ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 139

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 142

ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์..... 144

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 145

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์.....	5
2.2	พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์……..	9
2.3	สายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย bifidobacteria และ propionibacteria ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด homo-polysaccharides(hopss) และชนิด hetero-polysaccharides(hepss)	18
2.4	การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ……	20
2.5	การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ……..	24
2.6	แสดงจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายและอุณหภูมิการย่อยสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม……..	28
4.1	ลักษณะโคโลนีเป็นเมือกเยิ้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่คัดแยกจากผักและผลไม้ดอง……...	55
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง……	56
4.3	แสดงชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3หลังจากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที…….……....	58
4.4	แสดงจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายและอุณหภูมิการย่อยสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ……..……..	60
4.5	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ……	66

ตารางที่ หน้า

4.6 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ..... 67

4.7 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช (น้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตราส่วน 1:1..... 69

4.8 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ..... 71

4.9 ผลการจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา..... 73

4.10 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ..... 75

4.11 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3..... 77

4.12 แสดงปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนมเปรียบเทียบกับการไม่เติมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน..... 79

4.13 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 82

4.14 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3..... 84

4.15 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1..... 86

4.16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)..... 88

ตารางที่		หน้า
4.17	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	90
4.18	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันความเข้มข้นของซูโครสเป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 กรัมต่อลิตร	91
4.19	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone	92
4.20	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract	94
4.21	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 30 35 37 และ 40 องศาเซลเซียส	95
4.22	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ	96
4.23	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีและไม่เขย่า	97
4.24	สรุปสูตรอาหารดัดแปลงใหม่และภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย สายพันธุ์ LAB1 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 10% โดยปริมาตร	98
5.1	ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3	104
5.2	ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3	104

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ก) แป้งในพืชที่ประกอบด้วยอะไมโลส [poly(1,4-α-D-glucose)] และอะไมโลเพคติน [1,6-branched amylose] ข) เซลลูโลสในพืช……..	6
2.2	ตำแหน่งของพอลิแซ็กคาไรด์ในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ CPS = Capsular polysaccharides (แคบซูล), EPS = exopolysaccharides (ชั้นเมือก)……	7
2.3	โครงสร้างของเดกซ์แทรน……..	11
2.4	โครงสร้างของเคอร์ดแลน……..	12
2.5	โครงสร้างของเซลลูโลส……..	13
2.6	โครงสร้างของลีแวน……..	13
2.7	โครงสร้างของโครงสร้างของอัลเทอแนน……..	14
2.8	โครงสร้างของแซนแทนกัม……..	15
2.9	โครงสร้างของเจลแลน……..	16
2.10	เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)……..	26
4.1	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ที่มีเมือกเยิ้มและมีความหนืด บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง……	56
4.2	เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง……..	57
4.3	โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ข) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดซัลฟูริก……..	59

รูปที่		หน้า
4.4	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN07 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	62
4.5	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	63
4.6	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	64
4.7	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB3 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน.....	65
4.8	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ก) แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 กว้าง 0.8-1.0 ไมครอน ยาว 1.0-2.0 ไมครอน ข) แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 กว้าง 0.8-1.0 ไมครอน ยาว 1.5-2.0 ไมครอน.....	72
4.9	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN14 EP11 และ EP14 บนอาหารแข็ง MacConkey.....	74
4.10	แสดงสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 ที่ความเข้มข้น 0.2–1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	82
4.11	phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Enterococcus raffinosus* เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	89

รูปที่ หน้า

4.12 รูปแบบการเจริญและน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง……..... 99

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ของโมโนแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในธรรมชาติ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเนื่องจากมักเป็นพอลิเมอร์สายยาว พอลิเมอร์นี้มีลักษณะเป็นเส้นตรงหรือมีการแตกกิ่งก้านสาขา โดยที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ประกอบกันเป็นพอลิเมอร์นี้จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก เราสามารถจำแนกพอลิแซ็กคาไรด์ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ 1) Homopolysaccharides หรือ Homopolymers ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว และ 2) Heteropolysaccharides หรือ Heteropolymers ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (Dumitriu, 1998)

พอลิแซ็กคาไรด์ได้รับการใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมยา (Lopez และคณะ, 2003) อุตสาหกรรมผลิตสารทำความสะอาด อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมันดิบ และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (Yalpani และ Sandford, 1987) เป็นต้น พอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติมีความเหมาะสมต่อการใช้งานเนื่องจากไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อมและสามารถย่อยสลายได้ง่าย ด้วยสมบัติทางกายภาพทางเคมี และสมบัติการไหล (rheological properties) ที่แตกต่างกันของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ ทำให้สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ตามลักษณะสมบัติของมันอย่างกว้างขวาง (Moreno และคณะ, 1998) เช่น ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้เสถียร สารจับเกาะ สารก่อเจล สารทำให้เลือดแข็งตัว สารหล่อลื่น สารขึ้นรูปฟิลม์ สารทำข้น และสาร แขวนลอย เป็นต้น (Margaritis และ Pace, 1985)

ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีทั้งที่ได้จากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ และมีจำหน่ายในทางพาณิชย์ทั้งชนิดที่ผลิตจากพืช สัตว์ จุลินทรีย์ (Dumitriu, 1998) ทั้งนี้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ได้ทวีความสำคัญกว่าอีกสองแหล่ง พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นั้นมีทั้งชนิดที่ก่อโรคและที่ไม่ก่อโรค โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่อาจมีองค์ประกอบและสมบัติทางเคมีและกายภาพที่แตกต่างกันไป (Sandford, 1979) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะของการเจริญมีผลต่อพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วย (Margaritis และ Pace, 1985)

ตามปกติจุลินทรีย์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรมต้องให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก (Slodki, 1978) และผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องมีความเหมาะสมต่อการใช้งาน เช่น การทนต่อความร้อน เนื่องจากทางอุตสาหกรรมมีขั้นตอนในการให้ความร้อนเพื่อเปลี่ยนรูปพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารชนิดต่างๆ (Whistler และ BeMiller, 1973) ความเสถียรต่ออุณหภูมิ อุณหภูมิหลอมเหลว หลอมเหลว และการเปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์ต่ออุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นสมบัติที่มีผลต่อการใช้งานของพอลิเมอร์นั้นๆ สมบัติเหล่านี้สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ TGA (thermogravimetric analysis) (Zohuriaan และ Shokrolahi, 2004) สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมักจะมีลักษณะของการละลายน้ำได้ บางชนิดเกิดความหนืดสูง (Roller และ Dea, 1992; Tombs และ Harding, 1998) หรือบางชนิดเกิดความหนืดต่ำ ขึ้นอยู่กับการนำไปประยุกต์ใช้งานในผลิตภัณฑ์อาหารนั้น (De Vuyst และ Degeest, 1999) สามารถในการอุ้มน้ำได้ (Water holding capacity) (Anonymous 1996) อาจใช้เป็นสารอิมัลชัน เช่น ในน้ำสลัด (Sutherland, 1990) ก่อเจล ซึ่งเป็นสมบัติที่มีความสำคัญในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสได้ โดยที่บางชนิดสามารถก่อเจลได้ในความเข้มข้นต่ำประมาณ 1% เท่านั้น สำหรับพวกที่ไม่มีความสามารถในการก่อเจลอาจได้รับการใช้ตามความสามารถอื่น เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) (Nitta และ Nishinari, 2005) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ (bioflocculant) ในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม เครื่องดื่ม หรือใช้ในขั้นตอน downstream processing ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีความปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม และยังเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (Salehizadeh และคณะ, 2000; Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001; Zhang และคณะ, 2007)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแต่ละชนิด จะมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพแตกต่างกัน จึงนำไปใช้ได้ไม่เหมือนกัน (Stephen และคณะ, 2006) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ในด้านที่เหมาะสม (De Vuyst และคณะ, 2001)

การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องพอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนใหญ่จะเพื่อหาพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ ๆ ที่มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ในงานต่าง ๆ ซึ่งมีความหลากหลายและสมบัติที่แตกต่างกันไปแล้วแต่งานที่จะใช้ การวิเคราะห์ต่าง ๆ เช่น การหาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ การศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ จึงเป็นที่สนใจสำหรับการศึกษาคัดเลือกพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีลักษณะที่ต้องการหรือนำไปประยุกต์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมนั้น ๆ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์และหาลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่เลือก

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1. เก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิเมอร์ได้
2. ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่เลือกจากธรรมชาติ
3. ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์
4. คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่เหมาะสมเบื้องต้น และศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
5. คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในอุตสาหกรรม
6. พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน
7. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อการเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ทราบสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์สำหรับการคัดเลือกและใช้งานต่อไป

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

คาร์โบไฮเดรตที่พบในธรรมชาติส่วนมากเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อาจมีลักษณะเป็นเส้นตรงหรือมีการแตกกิ่งก้านสาขา ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือ อนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide derivatives) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบเป็นส่วนมากในพอลิแซ็กคาไรด์ คือ D-glucose ตามด้วย D-mannose, D-fructose, D- และ L-galactose, D-xylose,D-arabinose,D-glucosamine, D-galactosamine, D-glucuronic acid, *N*-acetyl muramic acid และ *N*-acetyl neuraminic acid ในขณะที่พบ D- หรือ L-rhamnose และ D- หรือ L- fucose บ้าง จากการที่พบพอลิแซ็กคาไรด์สามารถมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แตกต่างกันทำให้สามารถจำแนกพอลิแซ็กคาไรด์เป็น 2 ชนิด ได้แก่ (Dumitriu, 1998)

1) Homopolysaccharides หรือ Homopolymers ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว เช่น เดกซ์แทรน เคอร์ดแลน(Curdlan) เซลลูโลส ลีแวน(Levan) และพอลิกาแลคโตซามีน เป็นต้น

2) Heteropolysaccharides หรือ Heteropolymers ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมีมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป เช่น แซนแทน(Xanthan) วีแลน(Welan) เจลแลน(Gellan) อัลจิเนต (Alginate) ซักซิโนไกลแคน(Succinoglycan) กรดไฮยาลูโรนิค(Hyaluronic acid) และอิมัลแซน (Emulsan) เป็นต้น (Harrah และคณะ, 2006)

พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันจึงทำให้คุณสมบัติหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันไป ความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับ 4 ชนิด ดังตารางที่ 2.1 (Dumitriu, 1998) อันได้แก่

1) ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของหน่วยย่อย
2) โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ การจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยและชนิดของพันธะที่ใช้เชื่อมต่อ

3) มวลโมเลกุล

4) ชนิดและและการจัดเรียงของส่วนแทนที่

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์

ปัจจัย	ตัวอย่าง : xanthan
ส่วนประกอบ	กลูโคส : กลูโคโรนิก แอสิด : แมนโนส (2:1:2)
โครงสร้าง	แกนกลาง (backbone) ของสายพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยสองหน่วยของ β-D-glucose เชื่อมตรงตำแหน่ง 1 และ 4 สายด้านข้าง (side chain) ประกอบด้วยแมนโนส 2 ตัว และกลูคิวโรนิก 1 ตัว เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก
มวลโมเลกุล	(2-15) x 10^6
ส่วนแทนที่	อะซิเตทและกลุ่มไพรูเวทที่หน่วยของแมนโนส

ที่มา: (Dumitriu, 1998)

ในธรรมชาติพอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จากหลายแหล่ง (Mironescu, 2003) ได้แก่

1) สัตว์ เช่น ไคติน ไกลโคลเจน

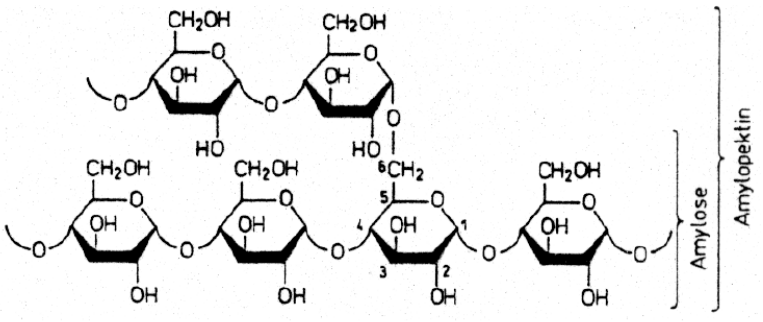
2) พืช เช่น แป้ง เซลลูโลส เพคติน และกาแลคโตแมนแนน

3) สาหร่าย เช่น วุ้น คาราจีแนน และแอลจิเนท

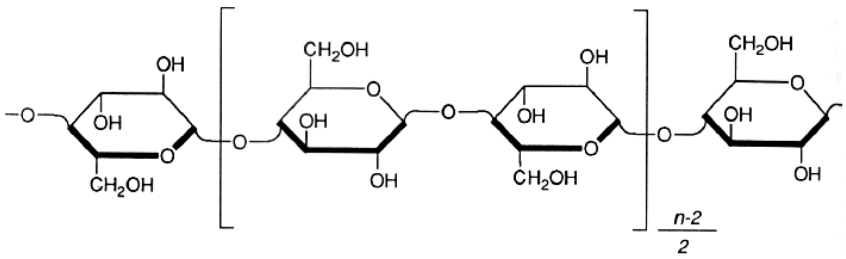
4) จุลินทรีย์ เช่น แซนแทน เจลแลน เซลลูโลส กรดไฮยาลูโรนิค และซักซิโนไกลแคน เป็นต้น

5) ยีสต์และรา ซึ่งพบเป็นส่วนน้อย (Sutherland, 1990)

โดยพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีหน้าที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง (structural polysaccharide) เป็นแหล่งสะสมพลังงาน (storage polysaccharide) และเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่เซลล์ เช่น จุลินทรีย์มีแคปซูลเป็นโครงสร้างเพื่อใช้ห่อหุ้มเซลล์ แป้งและไกลโคลเจนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานอย่างมากในพืชและสัตว์ ตามลำดับ ส่วนเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างและผนังเซลล์ในพืช แสดงดังรูปที่ 2.1 (Whitfield, 1998)



(ก)

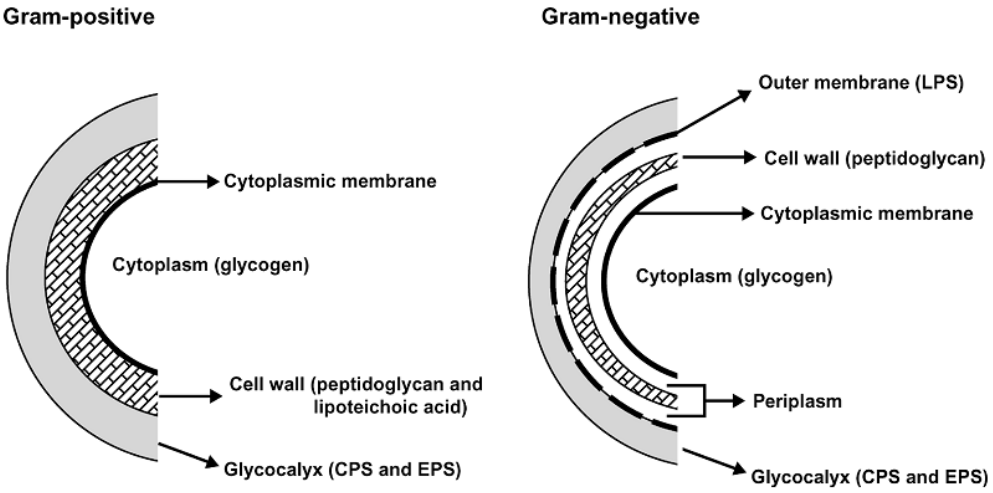


(ข)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ก) แป้งในพืชที่ประกอบด้วยอะไมโลส [poly(1,4-α-D-glucose)] และอะไมโลเพคติน [1,6-branched amylose] ข) เซลลูโลสในพืช
ที่มา : Whistler และ BeMiller (1993)

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ (Microbial exopolysaccharides)

จุลินทรีย์ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อทำหน้าที่หลายอย่าง คือ 1) เพื่อสะสมอาหาร ได้แก่ ไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งอยู่ตรงตำแหน่งไซโตพลาสซึม (cytoplasm) 2) เพื่อทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ ได้แก่ เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) และกรดไลโพไทโคอิค (lipoteichoic acids) ในแบคทีเรียแกรมบวก และไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharides) ตรงผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียแกรมลบ แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.2 ตำแหน่งของพอลิแซ็กคาไรด์ในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ CPS = Capsular polysaccharides (แคบซูล), EPS = exopolysaccharides (ชั้นเมือก) (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005)

นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ละลายอยู่ในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลชีพนั้นๆมีลักษณะข้นหนืด เรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ หรือ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) นิยมนำเชื้อเหล่านี้มาผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพราะง่ายต่อการสกัด และแยกออกจากผนังเซลล์ (Sandford, 1979)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะให้การสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป (Sandford, 1979) ซึ่งในธรรมชาติจุลินทรีย์จะผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นเพื่อทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น ความแห้งแล้ง สิ่งแปลกปลอม การโจมตีของไวรัส แอนติไบโอติก หรือสารพิษ(ไอออนของโลหะที่เป็นพิษ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เอทานอล) และความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ทำหน้าที่เกาะติดกับพื้นผิวและสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) (Cerning, 1990)

ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นั้นคือสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น มีขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยาก และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย (Yun และ Park, 2003) โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูกาล หรือมลพิษทางทะเล ในขณะที่เราต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้เมื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าพืชหรือสาหร่าย (Freitas และคณะ, 2009) โดยการวิจัยที่มีประวัติศึกษากันมาระยะเวลายาวนานสำหรับการผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ในถังหมักที่ถูกรายงายเป็นอันดับแรกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ได้แก่ เดกซ์แทรน (dextran) ซึ่งผลิตได้จาก *Leuconostoc mesenteroides* ขณะที่การผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นเชื้อก่อโรคถูกพัฒนามาและได้รับการรับรองจาก United States Food and Drug Administration (FDA) ได้แก่ แซนแทนกัม ที่ผลิตได้จาก *Xanthamonas campestris* (Jana และ Ghosh 1997; Sanchez และคณะ, 1997) และปัจจุบันพบว่าแซนแทนกัมมีผลผลิตมากที่สุดทางการค้าในอุตสาหกรรมกาวแต่ละปีผลิตถึง 30,000 ตัน เป็นจำนวนเงิน 408 ล้านดอลลาร์ (Kalogiannis และคณะ, 2003)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ที่ใช้ในทางการค้าและมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในปัจจุบันได้แก่ แซนแทนกัม โดย *Xanthomonas compestris* เจลแลน โดย *Sphingomonas paucimobilis* แอลจิเนท โดย *Pseudomonas* sp. *Azotobacter vinelandii* และ *Azotobacter chrococcum* เซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinium* กรดไฮยาลูโรนิค โดย *Streptococcus equii* และซักซิโนไกลแคน โดย *Rhizobium* sp. (Sutherland, 1990; Sutherland, 1994) พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมยา (Lopez และคณะ, 2003) อุตสาหกรรมผลิตสารทำความสะอาด อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมันดิบ และในการบำบัดน้ำเสีย (Yalpani และ Sandford, 1987) เป็นต้น เนื่องจากเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติมีคุณสมบัติหน้าที่เฉพาะตัว ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ ประกอบกับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างกันในพอลิแซ็กคาไรด์ต่างชนิดทำให้สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมในวงกว้างขึ้นกับลักษณะเฉพาะตัวที่เหมาะสม (Moreno และคณะ, 1998) ตัวอย่างของจุลินทรีย์และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตและใช้ในทางอุตสาหกรรมได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์	จุลินทรีย์ที่ผลิต
อะซีแตน	*Acetobacter xylinium*
อัลจิเนต	*Acetobacter vinelandii*
เซลลูโลส	*Acetobacter xylinium*
ไคโตซาน	*Mucora* sp.
เคอร์ดแลน	*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*
ไซโคลโซโฟแรน	*Agrobacterium* sp. *Rhizobium* sp. *Xanthomonas* sp.
พอลิเมอร์ของ 6—-ดี-ออกซี- เฮกโซส	*Klebsiella* sp.
เดกซ์แทรน	*Leuconostoc mesenteroides* *Leuconostoc dextranicum* *Lactobacillus hilgardii*
อิมัลแซน	*Acinetobacter calcoaceticus*
กาแลคโตกลูโคพอลิแซ็กคาไรด์	*Achromobacter* sp. *Agrobacterium radiobacter* *Pseudomonas marginalis* *Rhizobium* sp. *Zooglea* sp.
เจลแลน	*Auremonas elodea* *Sphingomonas paucimobilis*
กลูคูโรแนน	*Rhizobium meliloti*
เอ็นอะซิทิลเฮปะโรแซน	*Escherichia coli*
กรดไฮยาลูโรนิค	*Streptococcus equi*
อินดิแคน	*Beijerinckia indica*
เคอฟิแลน	*Lactobacillus hilgardii*

ตารางที่ 2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ (ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์	จุลินทรีย์ที่ผลิต
เลนติแนน	*Lentinus elodes*
ลีแวน	*Alcaligenes viscosus* *Zymomonas mobilis*
พูลลูแลน	*Aureobasidium pullulans*
สเครอโรกลูแคน	*Sclerotium rolfsii* *Sclerotium delphinii* *Sclerotium glucanicum*
ชิโซไฟแลน	*Schizophyllum commune*
ซักซิโนไกลแคน	*Alcaligenes faecalis var.myxogenes*
แซนแทนกัม	*Xanthomonas compestris*
วีแลน	*Alcaligenes* sp.
ไม่มีชื่อ	Dairy and meat starters: *Cyanothece* sp. *Cyanothece capsulata*

ที่มา: (Sutherland, 1990; Margaritis และ Pace, 1985; Graber และคณะ, 1988; Roller และ Dea, 1992; Crescenzi, 1995; Paul และคณะ, 1986; Lee, 1997 และ Pidoux และคณะ, 1990)

ลักษณะที่พึงประสงค์ของจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ได้แก่ (Slodki, 1978)

1) พอลิเมอร์ที่ผลิตได้ให้ความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ

2) ให้สมบัติทางกายภาพในการแพร่กระจายในสารละลายได้ดี

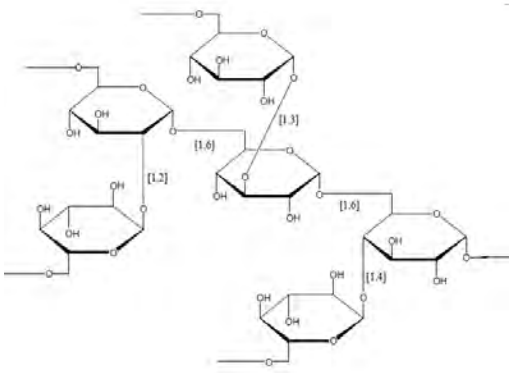
3) สามารถผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิดที่มีราคาถูก

4) พอลิเมอร์ถูกปลดปล่อยสู่อาหารเพาะเลี้ยงในการหมักไม่มากกว่า 2-3 วัน

ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ต่างชนิดอาจให้องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ต่างกัน จากสมบัติข้อนี้ทำให้ทำให้แบ่งพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็น 2 กลุ่ม ดังต่อไปนี้ (Margaritis และ Pace, 1985; Duboc และ Mollet, 2001)

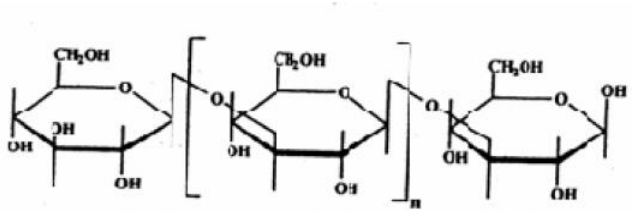
1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียว เช่น เดกซ์แทรน เคอร์ดแลน เซลลูโลส ลีแวน และอัลเทอแนน เป็นต้น ซึ่งการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้สันนิษฐานว่าถูกสร้างมาจากการทำงานและการควบคุมของเอนไซม์ที่มีระบบไม่ซับซ้อน

เดกซ์แทรนเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกหรือที่เรียกว่า กลูแคน โดยพันธะไกลโคซิดิกจะเป็นชนิด α 1,6-เป็นส่วนใหญ่ และยังประกอบด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α1,2- α1,3- และ α 1,4-เป็นส่วนของกิ่งสาขาอีกด้วย (Jeanes และคณะ, 1954; Robyt, 1986; Park และคณะ, 2001) แสดงดังรูปที่ 2.3 พอลิเมอร์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลสูงและมีประจุเป็นกลาง ในการผลิตในอุตสาหกรรมจะใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีมวลโมเลกุล 4-5 x 10^7 Da และสามารถนำเดกซ์แทรนมาใช้ประโยชน์เป็นตัวเพิ่มพลาสมาในเลือด ดัดแปลงให้เป็นเซฟาเดกซ์ (Sephadex) และใช้เป็นสารต้านการจับตัวเป็นก้อนของเลือด(anti-coagulant) (Monsan และคณะ, 2001) ซึ่งการเชื่อมต่อของเดกซ์แทรนนั้นเป็นการเชื่อมต่อแบบไม่ซับซ้อน สามารถย่อยสลายได้ง่าย จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาเป็นส่วนมาก (Gumagalieva และคณะ , 1998; Cascone และคณะ, 2001)



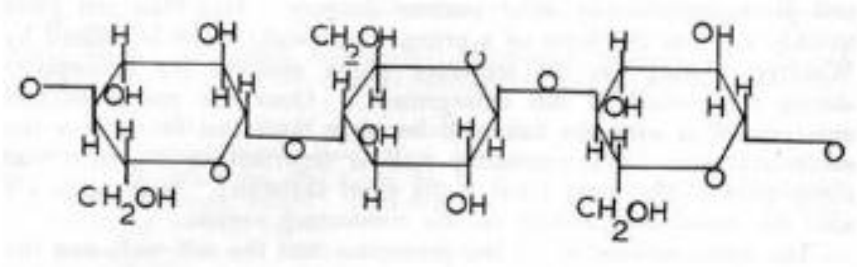
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเดกซ์แทรน
ที่มา: Prabhat และ Sushant (2009)

เคอร์ดแลน หรือ β-1,3-glucan เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกเป็นชนิด β-(1,3) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.4 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes faecalis* ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตที่ผลิตได้จะมีมวลโมเลกุลต่ำ(น้อยกว่า 100 kDa) และมีค่าความสามารถละลายน้ำได้ต่ำ สามารถรวมตัวเป็นเป็นเจลที่ยืดหยุ่นได้เป็นสารแขวนลอยกับน้ำเมื่อโดนความร้อน (Nishinari และคณะ, 2000; Zhang และคณะ, 2002) ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้เคอร์ดแลนเป็นสารเติมแต่งในอาหาร เช่น ใช้เคลือบผิว (Coating) และ เพิ่มเนื้อสัมผัส เป็นต้น



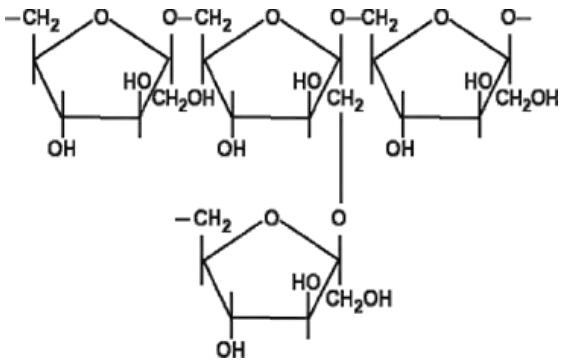
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเคอร์ดแลน
ที่มา: Moscovici และคณะ (2009)

เซลลูโลสเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นเส้นตรงที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยพันธะไกลโคซิดิกจะเป็นชนิด β-(1,4) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.5 โดยผลิตได้จากแบคทีเรีย *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina* และ *Zoogloea* เป็นต้น พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้มีโครงสร้างที่แข็งแรง มีการนำไประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้รักษาทางผิวหนังและฟัน ส่วนในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สารเพิ่มความหนืด, สารเติมแต่งในอุตสาหกรรมกระดาษ และใช้เป็นแผ่นกันความร้อน (Jonas และ Farah, 1998; Vandammeet และคณะ, 1998)



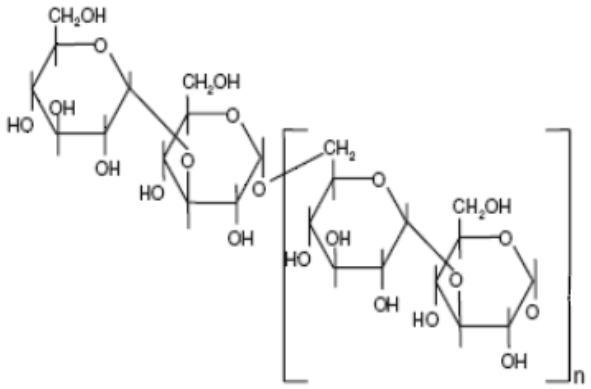
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเซลลูโลส
ที่มา: Smith (1971)

ลีแวนเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฟรุคโตสเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วย β-(2,6)-frutosyl-fructose เชื่อมต่อโมเลกุลและสายอื่น ดังโครงสร้างที่แสดงไว้ในรูปที่ 2.6 น้ำหนักโมเลกุลของลีแวนที่ผลิตโดยจุลินทรีย์หรือจากการย่อยด้วยเอนไซม์พบอยู่ที่ประมาณ 2.5×10^{6} (Iizuka และคณะ, 1993) และผลิตโดย *Zymomonas mobilis* (Beker และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของลีแวน
ที่มา: Manandhar และคณะ (2009)

อัลเทอแนน (Alternan) เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกหรือที่เรียกว่า กลูแคน โดยมีการสลับพันธะระหว่าง α-(1,6) และ α-(1,3) ในสายพอลิเมอร์นั้น แสดงดังรูปที่ 2.7 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ และสารละลายที่ได้มีความหนืดต่ำ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางการค้าในผลิตภัณฑ์ที่ให้ความหนืดต่ำหรือเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์นั้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ (De Vuyst และ Degeest, 1999)

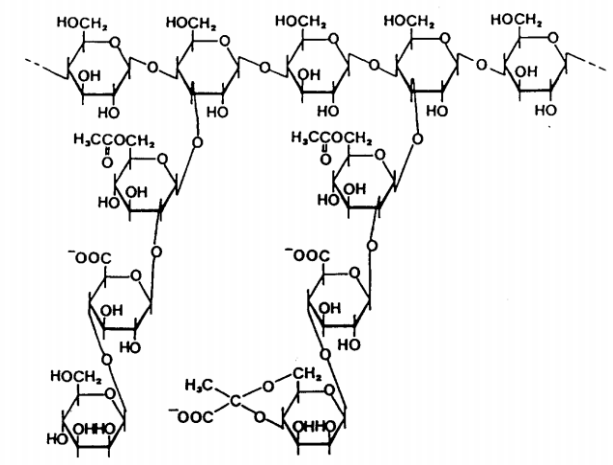


รูปที่ 2.7 โครงสร้างของอัลเทอแนน
ที่มา: Korakli และ Vogel (2006)

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของโมโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น แซนแทนกัม และเจลแลน เป็นต้น ซึ่งการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้สันนิษฐานว่าถูกสร้างขึ้นมาจากการทำงานและการควบคุมของเอนไซม์ที่มีระบบซับซ้อน

แซนแทนกัมเป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบ ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของเพนตะแซ็กคาไรด์(pentasaccharide) ประกอบไปด้วย ดี-กลูโคส, ดี-แมนโนส และ ดี-กลูคิวโรนิกแอซิด ในอัตราส่วนทั้งหมด 2:2:1 โดยมี acetal-เชื่อม pyruvic acid และ D-acetyl group (Baird, 1989) โดยที่แกนกลางของสายพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยสองหน่วยของ β-D-glucose

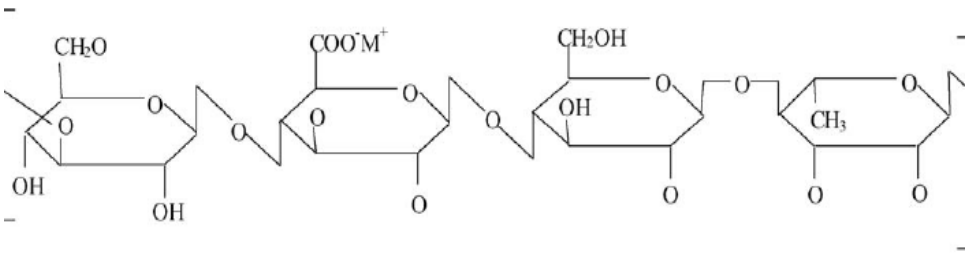
เชื่อมตรงตำแหน่ง 1 และ 4 สายด้านข้างที่ประกอบด้วยแมนโนส 2 ตัว และกลูคิวโรนิก 1 ตัว ดังนั้นทั้งสายจึงประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล 5 หน่วย สายข้างเชื่อมกับกลูโคสอื่นตำแหน่งที่ 3 ของแกนกลาง หน่วยของแมนโนสมีหมู่กรดไพรูวิคเชื่อมเป็น ketal ที่ตำแหน่ง 4 และ 6 หน่วยแมนโนสอื่นมีกลุ่ม acetyl ตำแหน่งที่ 6 มวลโมเลกุลของแซนแทนกัม 10^6-10^7 Da โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.8 โดยแซนแทนกัมผลิตจาก *Xanthomonas campestris* ในการหมักแบบใช้อากาศ ซึ่งแซนแทนกัมเป็น พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรม เพราะมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด สารเพิ่มเนื้อสัมผัส สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม ทั้งนี้แซนแทนกัมยังได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) และ Generally Recognized As Safe (GRAS) และเป็น Qualified Presumption of Safety (QPS) คือมีความปลอดภัยในการบริโภค (Harrah และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแซนแทนกัม
ที่มา: Paul และคณะ (1986)

เจลแลนเป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีหน่วยเตตระแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง ประกอบด้วยดี-กลูโคส (Glc), ดี-กลูคิวโรนิก แอซิด (GlcA) และที่เหลือเป็นแอล-แรมโนส (Rha) (Jansson และคณะ, 1983; Baird, 1989) ซึ่ง (1-3)-b-β-glucose,(1-4)-β-D-glucuronic acid, (1-4)-β-D-glucose และ (1-4)-a-L-rhamnose เป็น backbone (Noda และคณะ, 2008;

Baird, 1989) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.9 มี O-acetyl และ glyceryl เป็นส่วนแทนที่ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Sphingomonas paucimobilis* มีมวลโมเลกุล 500 kDa ซึ่งเจลแลนมีคุณสมบัติในการเกิดเจลจึงนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (Harrah และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเจลแลน
ที่มา: Jiang และคณะ (2006)

ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโครงแบบ และตำแหน่งของพันธะไกลโคซิดิกและลักษณะของสายพอลิเมอร์ที่เป็นสายตรง(linear) หรือที่แตกแขนง(branch) โครงสร้างที่แตกต่างกันนี้ จะมีผลทำให้พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดทำงานทางชีวภาพที่แตกต่างกัน (Lehninger, 1993)

2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย(Lactic acid bacteria หรือ LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก นำมาใช้ในการผลิตอาหาร ตัวอย่างเช่น bifidobacteria และ propionibacteria สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ ซึ่งปัจจุบันถูกพิจารณาเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ เช่น ในผลิตภัณฑ์นมและมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์ (Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) ทั้งนี้พอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ทันที เพราะเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียจัดเป็น Food-Grade Bacteria และได้รับการรับรองว่าเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) คือมีความปลอดภัยในการบริโภค (Mogensen และคณะ, 2002) การศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวนมากที่สามารถผลิต

พอลิแซ็กคาไรด์ได้และเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมอยู่ภายนอกเซลล์(Exopolysaccharides) ดังนั้นจึงแยกจากการหมักได้ง่าย นอกจากนี้เชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียยังเป็นจุลินทรีย์ประเภท Facultative anaerobe คือ จุลินทรีย์ไม่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนเล็กน้อยหรือไม่มีก๊าซออกซิเจนก็ได้ ซึ่งลักษณะนี้จึงทำให้เชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีความน่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (สุวิมล และคณะ, 2540)

แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ส่วนใหญ่คัดแยกเชื้อจากอาหารหมักดองชนิดต่างๆ เช่น แป้งหมัก(sourdoughs) ไส้กรอก ชีส โยเกิร์ต คีเฟอร์(kefir) นมเปรี้ยว และอาหารพื้นเมืองบางชนิดของประเทศที่ไม่มีโรงงานอุตสาหกรรม (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005; Mozzi และคณะ ,2006) โดยที่เชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ออกมา ไม่ได้ใช้เป็นแหล่งพลังงานแต่ผลิตเพื่อใช้ป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Ruas-Madiedo และคณะ, 2008) ส่วนลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ homopolysaccharides(hopss) ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว ส่วนใหญ่เป็นกลูโคสและฟรักโตส โดยต่อกันเป็นสายยาวเป็นกลูแคนและฟรักแทน ตามลำดับ ส่วน heteropolysaccharides(hepss) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมีมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป อาจมีส่วนแทนที่อินทรีย์หรือส่วนแทนที่อนินทรีย์ (Monsan และคณะ, 2001; De Vuyst และคณะ, 2001; Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย bifidobacteria และ propionibacteria ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด homo-polysaccharides(hopss) และชนิด hetero-polysaccharides(hepss)

ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์	Genus	Species
HoPSs		
α-glucan		
	Lactococcus	*Lc. lactis*
	Lactobacillus	*Lb. reuteri, Lb. sakei, Lb. fermentum, Lb. plantarum*
	Leuconostoc	*Leu. mesenteroides subp. dextranicum,*
		Leu. Citreum
	Weissella	*W. cibaria*
β-glucan		
	Lactobacillus	*Lb. diolivorans*
	Oenococcus	*O. oeni*
	Pediococcus	*P. parvulus, P. damnosus*
Fructan		
	Lactobacillus	*Lb. acidophilus, Lb. panis, Lb. plantarum,*
		Lb. reuteri, Lb. sanfranciscensis
	Leuconostoc	*Leu. Mesenteroides*
Polyga-lactan	*Lactococcus*	*Lc. lactis subsp. Lactis*
HePSs		
	Lactococcus	*Lc. lactis subsp. cremoris*
		Pr. freudenreichii subsp. shermanii

ตารางที่ 2.3 สายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย bifidobacteria และ propionibacteria ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด homo-polysaccharides(hopss) และชนิด hetero-polysaccharides(hepss) (ต่อ)

ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์	Genus	Species
HePSs	*Lactobacillus*	*Lb. acidophilus*
		Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus
		Lb. curvatus
		Lb. helveticus
		Lb. paracasei
		Lb. rhamnosus
		Lb. sakei
		Lb. sanfranciscensis
	Streptococcus	*S. macedonius*
		S. thermophilus
	Bifidobacterium	*B. lactis*
		B. longum
	Propionibacterium	*Pr. acidipropionici*
		Pr. freudenreichii subsp. shermanii

ที่มา: Ruas-Madiedo และคณะ (2009)

ในส่วนของอุตสาหกรรมแลคติกแอสิดแบคทีเรียนั้นมีความสำคัญในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้วปล่อยออกมาสู่ผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น นม (Cerning, 1990; Cerning และ Marshall, 1999; De Vuyst และ Degeest, 1999; Ricciardi และ Clementi, 2000; Sikkema และ Oba, 1998) โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ชีส ครีมหมัก และอาหารว่างที่มีนมเป็นส่วนประกอบ (Bouzar, Cerning, และ Desmazeaud, 1997; Cerning, 1995; Chris-tiansen, Madeira และ Edelstein, 1999; Crescenzi, 1995) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ทำให้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีลักษณะ

ข้นหนืด เพิ่มเนื้อสัมผัส มีความเสถียร ซึ่งทำให้มีความพอใจสำหรับผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ทั้งในยุโรปและเอเชีย แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ

แบคทีเรีย	การใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม
Lactococci	
L. lactis subsp. Lactis	คัลเจอร์บัตเตอร์มิลค์(Cultured buttermilk), คีเฟอร์(Kefir)
L. lactis subsp. cremoris	คัลเจอร์บัตเตอร์มิลค์(Cultured buttermilk), คีเฟอร์(Kefir), ดาฮี(Dahi)
L. lactis biovar diacetylactis	คัลเจอร์บัตเตอร์มิลค์(Cultured buttermilk), คีเฟอร์(Kefir), ดาฮี(Dahi)
Streptococci	
S. thermophilus	โยเกิร์ต, ดาฮี(Dahi), มอสซาเรลล่า(Mozzarella)
Leuconostoc	
L. mesenteroides subsp. mesenteroides	คีเฟอร์(Kefir), คัลเจอร์ครีม(Cultured cream)
L. mesenteroides subsp. cremoris	คีเฟอร์(Kefir), คัลเจอร์ครีม(Cultured cream)
L. mesenteroides subsp. dextranicum	คีเฟอร์(Kefir), คัลเจอร์ครีม(Cultured cream)

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ (ต่อ)

แบคทีเรีย	การใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม
Bifidobacteria	
B. adolescentis	นมเปรี้ยว
B. bifidum	โยเกิร์ต
B. breve	โยเกิร์ต
B. infantis	โยเกิร์ต
B. longum	โยเกิร์ต
Lactobacilli	
L. delbrueckii subsp. delbrueckii	นมเปรี้ยว, โยเกิร์ต
L. delbrueckii subsp. lactis	นมเปรี้ยว
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	โยเกิร์ต, บัลแกเรียบัตเตอร์มิลค์(Bulgarian buttermilk), มอสซาเรลล่า(Mozzarella)
L. helveticus	คีเฟอร์(Kefir), คูมิส(koumiss), มอสซาเรลล่า(Mozzarella)
L. acidophilus	นมเปรี้ยวแอซิโดฟิลัส(Acidophilus Milk), คีเฟอร์(Kefir)
L. paracasei subsp. paracasei	นมเปรี้ยว
L. casei	โยเกิร์ต, นมเปรี้ยว
L. paracasei	โยเกิร์ต
L. rhamnosus	โยเกิร์ต
L. plantarum	คีเฟอร์(Kefir)
L. kefir	คีเฟอร์(Kefir)
L. brevis	คีเฟอร์(Kefir)
	คีเฟอร์(Kefir)

ที่มา: Litopoulou-Tzanetaki และ Tzanetakis (1999)

2.4 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติที่หลากหลายและแตกต่างกัน ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ที่มีสายยาวและมีมวลโมเลกุลสูงซึ่งสามารถละลายและแพร่กระจายในน้ำแล้วให้คุณสมบัติเป็นสารข้นหนืดหรือมีคุณสมบัติเป็นเจลซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหารได้ ดังนั้นด้วยลักษณะสมบัติที่หลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์จึงถูกนำไปใช้ในอาหาร โดยใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์(emulsifier) สเตบิไลเซอร์(stabilizer) สารก่อการจับกลุ่ม(flocculant) สารยึดจับ(binders) สารทำให้อนุภาคแขวนลอย สารควบคุมการตกผลึก สารยับยั้งสารสกัดออกจากของเหลว สารห่อหุ้ม และสารก่อฟิล์ม (De Vuyst และ Degeest, 1999; Sandford และคณะ, 1984) หรืออาจใช้ในด้านอุตสาหกรรมอื่นโดยใช้เป็นสารหล่อลื่น(lubricant) สารยึดเกาะ สารลดการขัดสีและสารเคลือบผิวของวัตถุ (Sandford และคณะ, 1984) พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เช่น ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (Fan และคณะ,2007) และยังมีกิจกรรมทางด้านสรีรวิทยาที่หลากหลายในคน เช่น การต่อต้านมะเร็ง(anti-tumor) ต่อต้านไวรัส (anti-viral) และต่อต้านการอักเสบ(anti-inflammatory) เช่นกัน (Calazans และคณะ,1997)

ลักษณะสมบัติทางกายภาพที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ ซึ่งประยุกต์ใช้ในการก่อสร้างคอนกรีตเพื่อป้องกันการแตกแยกของชั้นคอนกรีต (Anonymous 1996) อุณหภูมิหลอมเหลว วิเคราะห์โดยใช้ TGA (thermogravimetric analysis) ทำให้ทราบความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์ (Zohuriaan และ Shokrolahi, 2004) โดยจากการศึกษาสมบัติทางความร้อน ทำให้นำไปใช้ในการขุดเจาะน้ำมันที่สามารถทนความร้อนสูงได้ การละลายน้ำและความหนืด เช่น แซนแทนกัมเมื่อละลายน้ำจะมีความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ จึงประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมสีและสารเคลือบผิว (Rinaudo และ Milas, 1978) หรือพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดเมื่อละลายน้ำจะให้ความหนืดต่ำ เช่น อัลเทอแนน (Alternan) และกัมอารบิก (Gum Arabic) สามารถละลายน้ำได้ดี โดยที่ความเข้นข้นต่ำ สารละลายที่ได้จะมีความหนืดต่ำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางการค้าในผลิตภัณฑ์ที่ให้ความหนืดต่ำหรือเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์นั้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ (De Vuyst และ Degeest, 1999; Nieto และ Andon, 2009; Belitz และคณะ, 2009) การมีความสามารถเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ นำไปใช้ในน้ำสลัดหรือน้ำเครื่องปรุงชนิดต่างๆ (Lai และ Lii, 2004) สารเพิ่มความคงตัว นำไปใช้ในไอศกรีมและผลิตภัณฑ์นม (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) และการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม สามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม

เครื่องดื่ม หรือในขั้นตอน downstream processing ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้ (Wang และคณะ, 2008)

นอกจากนี้ลักษณะสมบัติทางเคมียังมีความสำคัญ ตัวอย่างเช่น ส่วนประกอบทางเคมี เช่น เชื้อในกลุ่ม Alteromonadaceae มีกรดยูโรนิก ซัลเฟต และ ฟอสเฟต เป็นส่วนประกอบซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น bio-detoxifiers ได้ (Mata และคณะ, 2008) ขนาดโมเลกุล เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีความสามารถใช้เป็นตัวจับในการดึงเอาโลหะหนักออกจากน้ำหรือชะโลหะหนักที่มีคุณค่าออกจากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (De philippis และคณะ, 2000) ทั้งนี้โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น น้ำหนักโมเลกุล การแทนที่ของสาร ส่วนประกอบของน้ำตาล และโครงสร้างหลักที่เป็นเส้นตรงหรือแตกกิ่งก้านสาขา มีความสำคัญต่อสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ (Bohn และ BeMiller, 1995; Kennedy และ White, 1983; Kennedy, 1989) และพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะตัวเพราะมีโครงสร้างโมเลกุลที่จำเพาะแตกต่างกัน เช่น lacquer polysaccharide (LP) มี 1,3-β-เชื่อมกับ D-galactopyranosidic เป็นโซ่หลักและมีการแตกกิ่งก้านซับซ้อนด้วย 4-*O*-methyl-β-glucuronic acid จึงเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความทนทานสูงใช้ในการเคลือบฟิล์ม (Oshima และ Kumanotani, 1984; Du และคณะ, 1994) โดยการประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทางการค้าต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ

การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม	คุณสมบัติ	พอลิแซ็กคาไรด์
สารยึดเกาะ - กาวเลเท็ค(Latex) - ปูนซีเมนต์ - กระดาษปิดผนัง(Wallpaper)	ควบคุมการไหล (Rheology) ของสาร เพิ่มความคงตัว และทำให้สารข้นหนืด	แอลจิเนต และแป้ง
การเกษตร - ยาฆ่าแมลง - ปุ๋ยน้ำ - สารเติมแต่งในอาหารสัตว์	เป็นส่วนผสมและควบคุมการลอยตัวของสารละลาย	แซนแทนกัม
เครื่องปั้นเผา, วัตถุทนความร้อน,ลวดเชื่อม	ช่วยเพิ่มความลื่นและเคลือบผิวให้กับวัตถุ	แอลจิเนต
สารขัด	นำมาใช้ขัด	แซนแทนกัม
สารดับเพลิง	ทำให้เนื้อโฟมคงตัว	แซนแทนกัม และกัวกัม
งานเกี่ยวกับเหล็ก - การเคลือบผิวโลหะ - อุปกรณ์ตัดแยกแร่	เป็นส่วนผสมและเคลือบผิว	แซนแทนกัม และแป้ง
การขุดเจาะน้ำมัน - โคลนเจาะ - ความเป็นกรดเบส	ทำให้เกิดความหนืด เสถียรต่อความเป็นกรดเบส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น	แซนแทนกัม
งานสี	เป็นส่วนผสมและควบคุมการไหล(Rheology) ของสาร	ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส และเมทิลเซลลูโลส
เจลดับกลิ่นในห้อง	คงสภาพความเป็นเจล	คาราจีแนน

ตารางที่ 2.5 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ (ต่อ)

การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม	คุณสมบัติ	พอลิแซ็กคาไรด์
อาหาร		
- ขนมหวาน	สารก่อเจล	คาราจีแนน, เพคติน
- น้ำผลไม้	สารเพิ่มความข้นหนืด	แซนแทนกัม
- นม	สารเพิ่มความคงตัว	คาราจีแนน, โลคัสบีนกัม
- น้ำสลัด	สารอิมัลซิไฟเออร์	กัมอารบิก, เซลลูโลส
- ผลิตภัณฑ์อาหารสด	ฟิล์มและสารเคลือบ	เพคติน, ไคโตซาน
- ยา	สารยึดเกาะ	เมทิลเซลลูโลส

ที่มา: Sandford และคณะ (1984); Lai และ Lii (2004)

อุตสาหกรรมเกี่ยวกับพอลิแซ็กคาไรด์ในสหรัฐอเมริกา ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 3,000,000 ตัน ด้วยอัตราการเจริญทางการค้า 3 เปอร์เซ็นต์ต่อปี มูลค่าทางการตลาดนี้มีมากกว่า 3 แสนล้านดอลล่า (BeMiller ,1996) งานวิจัยในยุโรป แสดงความต้องการจากอุตสาหกรรมหรือจากผู้บริโภคสำหรับเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ๆ ยังมีความต้องการสูงขึ้นเรื่อยๆ (Crescenzi,1995) และต้องการค้นหาพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดใหม่ เพื่อมาแข่งขันทางการค้ากับตลาดโลก เนื่องจากต้องการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ที่มีสมบัติของไหล (rheological properties) มีประสิทธิภาพกว่าเดิม และต้องการลดระยะเวลารวมถึงลดต้นทุนในการผลิตด้วย (Paul และคณะ, 1986)

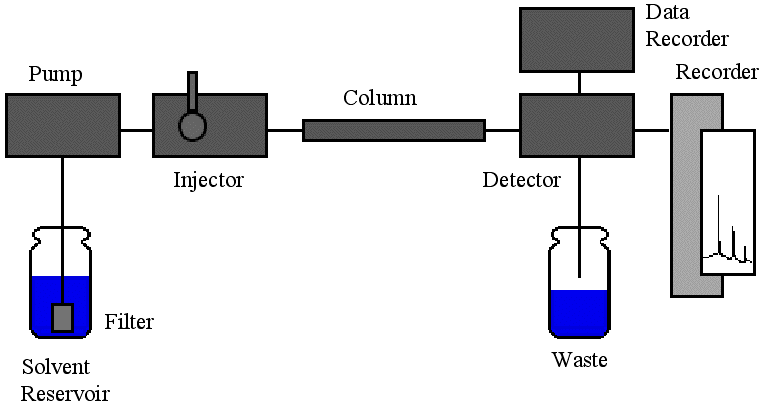
2.5 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

2.5.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromatography)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย สามารถใช้วิเคราะห์สารได้

หลากหลาย ให้ผลที่ถูกต้อง มีความแม่นยำสูงและรวดเร็ว (Hicks, 1988) สามารถวิเคราะห์สารทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ส่วนใหญ่เทคนิคนี้จะใช้สำหรับการแยกสารออกจากกัน (purification) เพื่อต้องการสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น ในการวิเคราะห์ทางด้านอาหาร ด้านยา และทางการแพทย์ เป็นต้น (Huber และ Majors, 2007)

โดย HPLC จะแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile Phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับการดูดซับของสารประกอบนั้นกับเฟสอยู่กับที่ สารที่ดูดซับได้ต่ำกับเฟสอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง (Lindsay,1991) และผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) แสดงดังรูปที่ 2.10 ซึ่งระบบ HPLC นี้จะแยกสารได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับการใช้แรงดัน เฟสเคลื่อนที่ เฟสคงที่ ขนาดของคอลัมน์ และอัตราการไหลที่แตกต่างกัน (Hicks, 1988)



รูปที่ 2.10 เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

ที่มา: Pieper และ Rutledge (1989)

2.5.2 เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis: TGA)

เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis) เป็นเทคนิควิเคราะห์สมบัติทางความร้อนโดยใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดและติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวอย่างเมื่อได้รับความร้อนภายใต้บรรยากาศที่กำหนด โดยการวิเคราะห์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนคุณสมบัติของตัวอย่างทำให้มีผลต่อน้ำหนักของตัวอย่างนั้น ซึ่งอาจจะนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบ โครงสร้าง และความเสถียรของสารตัวอย่างนั้นได้ (Reed และคณะ, 1994) ส่วนประกอบของเครื่องที่ทำหน้าที่สัมพันธ์กัน ประกอบด้วย 4 ส่วน ได้แก่ (Harlan และ Roberts, 1973)

1) เตาหลอมและระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยจะควบคุมการเพิ่มอุณหภูมิกับตัวอย่างทดสอบ
2) ระบบควบคุมภาวะบรรยากาศภายในเครื่องเมื่อใส่ตัวอย่างที่จะทดสอบลงไป
3) การวัดน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง (thermobalance) ในระหว่างการวิเคราะห์โดยวิเคราะห์น้ำหนักที่หายไป
4) ระบบบันทึกผลและแสดงผลทางจอภาพ โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักหรือเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปต่ออุณหภูมิที่ทำให้น้ำหนักของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงแล้วแสดงผลทางจอภาพ

การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้ TGA (thermogravimetric analysis) ทำให้ทราบความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและไม่ใช่อาหาร ที่สามารถทนความร้อนและพอลิแซ็กคาไรด์นั้นไม่ถูกย่อยสลายได้ง่าย เช่น นำไปใช้ในการขุดเจาะน้ำมัน หรือนำไปใช้ในกระบวนการที่มีความร้อน ในการละลาย การเปลี่ยนเป็นสารละลายข้นหนืด หรือการเปลี่ยนเป็นฟิล์มหรือสารเคลือบในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นจำต้องทราบความเสถียรต่อความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อนำไปใช้ในทางที่เหมาะสม (Othmer, 2007; Soares และคณะ, 2005; Whistler และ BeMiller, 1973) และได้มีงานวิจัยการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายและอุณหภูมิการย่อยสลายของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม

พอลิแซ็กคาไรด์ จากแบคทีเรียสายพันธุ์	จำนวนขั้นตอน กระบวนการสลาย	อุณหภูมิการย่อยสลาย (องศาเซลเซียส)
Arabic gum	1	32.9–164.6
	2	223.4-377.5
Tragacanth gum	1	35.0-193.1
	2	231.7-306.9
Xanthan gum	1	30.0-91.3
	2	251.5-330.3
Sodium alginate	1	32.0-140.3
	2	212.1-277.2
Chitosan	1	45.0-90.0
	2	282.5-358.4
Sodium carboxymethyl cellulose	1	42.0-196.4
	2	263.5-328.6
Hydroxyethyl cellulose	1	34.0-95.5
	2	233.1-354.2
Methyl cellulose	1	324.7-415.0

ที่มา: Zohuriaan และ Shokrolahi (2004)

2.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ(แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารอาหารอื่นๆ) ภาวะที่ใช้ในการเจริญ(ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และการให้ออกซิเจน) และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ (Degeest และคณะ , 2001)

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีหลายชนิด เช่น ซูโครส, กลูโคส, แลคโตส, มอลโตส, หางนม, แป้ง, แมนนิทอล ซอบิทอล และเมทานอล เป็นต้น ซึ่งแหล่งคาร์บอนเหล่านี้มีผลต่อปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Linton, 1994) ตัวอย่างเช่น การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ GSP-910 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งหมดที่ทดสอบได้ (กลูโคส ซูโครส แมนโนส กาแลคโตส ฟรุคโตส ไซโลส แลคโตส และมอลโตส) แต่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้กลูโคส ซูโครส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน (Manresa และคณะ, 1987) นอกจากนี้ในงานวิจัยต่างๆพบว่า การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Pseudomonas* sp. เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากพอในปริมาณที่เหมาะสม (Congregado และคณะ, 1985)

แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันยังมีผลทำให้ขนาดมวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้แตกต่างกันอีกด้วย ตัวอย่างเช่น อัลจิเนตสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารที่มีฟรักโทสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 500,000 และ 276,000 ตามลำดับ (Conti และคณะ, 1994)

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ปัจจุบันแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีหลายชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, เปปโตน, โซเดียมไนเตรต, ยูเรีย และ ยีสต์สกัด เป็นต้น ตัวอย่างในการใช้แหล่งไนโตรเจนในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น การผลิตพลูลูแลนในปริมาณมากจะใช้แอมโมเนียมซัลเฟสเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ซึ่งแหล่งไนโตรเจนยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและมีผลต่อปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Farres และคณะ, 1997)

นอกจากนี้ยังพบว่าคาร์บอนบางชนิดยังถูกพบในแหล่งไนโตรเจนได้ซึ่งเชื้อสามารถใช้เป็นซับสเตทในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้อีกด้วย (De Souza และคณะ, 1994) และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะช่วยส่งสริมกันทำให้ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดียิ่งขึ้น (Sutherland, 1983)

ในการศึกษาแลคติก แอซิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์กับแหล่งไนโตรเจนมีส่วนเกี่ยวข้องกัน (Degeest และ DeVuyst, 1999; Kimmel และคณะ, 1998)

2.6.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ โดยส่วนใหญ่พอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เป็นพวกที่เจริญอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส (mesophiles) (Lawson และ Sutherland, 1978) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เชื้อใช้ในการเจริญ เช่น *Klebsiella* sp. (Farres และคณะ, 1997; Mengistu และคณะ, 1994)

การผลิตสเครอโรกลูแคน (Scleroglucan) ซึ่งผลิตโดย *Sclerotium glucanicum* จะผลิตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส (Halleck, 1967) Lactobacilli จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส (Van Beek, 1997)

(Shu และ Yang, 1990; Shu และ Yang, 1991) ได้รายงานว่าแซนแทนกัมมีปริมาณสูงขึ้น เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิระหว่าง 30 องศาเซลเซียส และ 33 องศาเซลเซียส

2.6.4 ความเป็นกรดเบส

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเบสเป็นกลาง (Mengistu และคณะ, 1994; Dassy และคณะ, 1991; Williams และ Wimpenny, 1978) หรือเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดความเป็นกรดเบส (Farres และคณะ, 1997) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะผลิตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดเบสใกล้เป็นกลาง เช่น เมื่อควบคุมความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.0 ในกระบวนการหมักนมขาดมันเนยหรือหางนม จะสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.5 และ 5.8 ที่เชื้อใช้ในการเจริญ (Gassem และคณะ, 1997; Schellhaass, 1983)

(Racine และคณะ, 1991) ได้รายงานว่า ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในกระบวนการหมักหางนมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* คือ มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.0 และสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulansz* ผลิตได้ดีที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.5-5.5 (Lacroix และคณะ, 1985)

2.6.5 การให้อากาศ

การเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอย สามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ซึ่งออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลา โดยการถ่ายเทจากอากาศซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญได้ด้วยความหนาแน่นสูงภายใต้ภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นในขั้นตอนกระบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา การมีออกซิเจนเพียงพอที่จะนำไปใช้ได้โดยควบคุมการให้อากาศและความเร็วในการกวนสามารถรักษาปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ได้ไม่น้อยกว่า 30% (ในกรณีที่มีอยู่ 60%) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ (McNeely, 1967) มีความสอดคล้องกับในรายงานอื่นๆ

การเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเชื้อ *Aureobasidium pullulansz* มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Wecker และ Onken, 1991) และเมื่อจำกัดการเพิ่มปริมาณการให้ออกซิเจนในการเลี้ยงเชื้อ *Fusarium solani* มีผลต่อการผลิต (1$\rightarrow$3) β-D-glucan

การผลิตแซนแทนกัมจะสูงขึ้นเมื่อได้รับความเร็วรอบที่ 1000 รอบต่อนาที และระยะเวลาการหมักที่ 50 ชั่วโมง (Amanullah และคณะ, 1998)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
2. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
3. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clean, รุ่น V 3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
4. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert, Germany
5. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
6. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -80 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
9. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
10. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
11. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น Mikro 20 บริษัท Hettich Zentrifugen, Germany

15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
16. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
17. เครื่องดักไอสารละลายภายใต้ความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Japan
18. โถดูดความชื้น (desiccator)
19. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
20. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟี รุ่น 2000ES บริษัท Alltech, USA
21. คอลัมน์ Sugar SZ5532 บริษัท Shodex, Japan
22. เครื่อง Evaporative Light Scattering Detectors บริษัท Alltech, USA
23. เครื่อง Simultaneous thermal analyzer รุ่น 409 บริษัท Netzsch, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ซูโครส บริษัท Merck, Germany
2. อะราบิโนส (Arabinose) บริษัท Fluka, Switzerland
3. ฟรุกโตส (Fructose) บริษัท Fluka, Switzerland
4. กาแลคโตส (Galactose) บริษัท Difco, USA
5. กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany
6. แมนโนส (Mannose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
7. แรมโนส (Rhamnose) บริษัท Difco, USA
8. ไรโบส (Ribose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
9. ไซโลส (Xylose) บริษัท Difco, USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
10. แลคโตส (Lactose) บริษัท Merck, Germany
11. แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, German
12. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
14. สารสกัดจากยีสต์ บริษัท Biospringer, France
15. แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany

16. โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 บริษัท Becton, Dickinson and Company, Thailand
17. สารสกัดจากเนื้อ บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
18. ทวีน 80 บริษัท Merck, Germany
19. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต บริษัท Carlo Erba, Italy
20. โซเดียมอะซิเตรต บริษัท Merck, Germany
21. แมงกานีสซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
22. โบรโมครีซอล เพอร์เพิล บริษัท Fluka, USA
23. กลีเซอรอล บริษัท Merck, Germany
24. กรดไตรคลอโรอะซิติก บริษัท Merck, Germany
25. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
26. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany
27. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
28. แซนแทนกัม บริษัท Success chemical, Thailand
29. คาราจีแนน บริษัท Success chemical, Thailand
30. กัวกัม บริษัท Success chemical, Thailand
31. อะซีโตน (Acetone) บริษัท Merck, Germany
32. ไอโซโพรพานอล บริษัท Merck, Germany
33. เฮกเซน บริษัท Merck, Germany
34. เมทานอล บริษัท Merck, Germany
35. ฟีนอล บริษัท Merck, Germany
36. โคแมสซีบลู บริษัท Fluka, Switzerland
37. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
38. โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
39. โพแทสเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
40. แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
41. คอปเปอร์ซัลเฟส บริษัท Carlo Erba, Italy
42. ถ่านกัมมันต์ Merck, Germany
43. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1.1 แบคทีเรีย สายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551)

แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้รับการถ่ายจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ จากนั้นคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ออกมาด้วยการขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงจากอาหารสูตรข้างต้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.1.2 แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง

โดยทำการคัดแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากผักและผลไม้ดอง ได้แก่ มะม่วงดอง พุทราดอง มะยมดอง มะกอกดอง กระเทียมดอง ผักกาดดอง และหน่อไม้ดอง (van Geel-Schutten และคณะ, 1998) โดยนำลูปเขี่ยบริเวณตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในสูตรอาหาร MRS ที่ผสม bromocresol purple (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีขาวครีม ผิวเรียบเนียน และสามารถสร้างกรดได้ โดยสังเกตุการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แล้วเลือกโคโลนีนั้นมาเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกับข้างต้น เพื่อแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Ogunbanwo และ Okanlawon, 2009) จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยนำเชื้อบริสุทธ์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความ

เข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยสังเกตุจากลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าของอาหารแข็งที่มีเมือกเยิ้ม และมีความหนืด (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005)

3.3.1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.2.1 การเก็บเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 และแลคติกแอสิดแบคที่เรียที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ส่วนแบคทีเรียที่คัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8-1.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่เลือกจากธรรมชาติ

3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.2.1.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14

นำเชื้อบริสุทธิ์ในข้อ 3.3.1.1.1 มาใช้เป็นหัวเชื้อโดยถ่ายแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.2.1.2 แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักและผลไม้ดอง

นำเชื้อบริสุทธิ์ในข้อ 3.3.1.1.2 มาใช้เป็นหัวเชื้อโดยถ่ายแลคติกแอสิดแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.2.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

3.3.2.2.1 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

3.3.2.2.1.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14

นำแบคทีเรียมาตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อข้างต้นในข้อ 3.3.2.1.1 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.2.2.1.2 แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักและผลไม้ดอง

นำแลคติกแอสิดแบคทีเรียมาตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อข้างต้นในข้อ 3.3.2.1.2 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.2.2.2 การสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2.2.1.1 และ 3.3.2.2.1.2 มาทำการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อตกตะกอนเซลล์และโปรตีน (Lin และ Chien, 2007) แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วย ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 3 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (Kumar และคณะ, 2004) ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นปริมาตรเป็น 3 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Lin และ Chien, 2007) ทำให้น้ำหนักคงที่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยรายงานน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย

แต่ละสายพันธุ์ และนำส่งวิเคราะห์ตามข้อ 3.3.3.1 และ 3.3.3.2 ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.3.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.3.1.1 การย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดซัลฟูริก

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2.2 มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ จากนั้นรอให้เย็นและปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน แล้วจึงนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยเก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (วิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549)

3.3.3.1.2 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

3.3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.3.2.2.2 ปริมาณ 20–25 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Simultaneous Thermal Analyzer (STA) ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2004)

3.3.3.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

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

3.3.3.4 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ อะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น จากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

3.3.3.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช (น้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปเขย่าด้วยอัตรา 150 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifing activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

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

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

3.3.3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie blue (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) สรีรวิทยา (physiological characteristics) และทดสอบลักษณะทางชีวทางเคมี (biochemical test) บางประการ อ้างอิงตาม Clinical and Pathogenic Microbiology (Howard, 1994), Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994; Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986)

3.3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) และเพาะเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ดอง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี หลังจากนั้นทำการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีย้อมสีแกรม เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.4.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristics and Biochemical test)

โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักและผลไม้

ดอง เลี้ยงแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารชนิดต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่

3.3.4.2.1 ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง McConkey

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารแข็ง McConkey (ภาคผนวก ก) โดยบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อและเชื้อสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในอาหารได้ จะมีโคโลนีมีสีชมพูอ่อน

3.3.4.2.2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

ทดสอบการผลิตเอนไซม์ Cytochome oxidase ของแบคทีเรีย โดยหยดสารละลายรีเอเจนต์ 1 % tetramethel-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (ภาคผนวก ข) บนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อ และขีดเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงบนแผ่นกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรองภายใน 10 วินาที ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.4.2.3 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (Catalase test)

ทดสอบโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนีที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อายุ 24 ชั่วโมง แตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3%H_2O_2 (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ ถ้าฟองก๊าซเกิดขึ้นในทันที ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.4.2.4 ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test)

ทดสอบโดยเพาะเชื้อลงใน Motility test medium (ภาคผนวก ก) โดยปักเชื้อตรงๆ (stab) เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนลูปของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าเห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอบรอยปักเชื้อ (stab) ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.4.2.5 การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส ทำให้ได้กรดและอาจให้ก๊าซ เป็นผลผลิตสุดท้าย นอกจากนั้นยังเป็นการทดสอบถึงความสามารถของแบคทีเรียในการให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ด้วย ทดสอบโดยขีดเชื้อบนหน้าวุ้นของ TSI agar (ภาคผนวก ก) ให้ทั่วและปัก (stab) ปลายลูปที่ขีดเชื้อในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดย

1. ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่างๆ

1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวบนผิววุ้น (stant) ที่มีสีแดงส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอดเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A

1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตส หรือสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสามชนิดทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผล A/A

1.3 หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆเลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N K/N K/K) (N : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

2. การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นฟองอากาศ

3. การเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟต์ (H_2S) จะเห็นสีดำตะกอนเฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอด ถ้าเห็นสีดำบนผิวของวุ้น (slant) เป็นสีแดงของโคโลนีมากกว่า

3.3.4.2.6 การทดสอบ Indole test

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Tryptophan broth (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยหยดสาร Kovac's reagent (ภาคผนวก ข) ลง

ไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด จากนั้นเขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าสีของรีเอเจนต์เปลี่ยนไปเป็นสีแดง ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่เหมาะสมเบื้องต้น

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่น่าสนใจมีความเหมาะสมทางอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรค มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง ความสามารถในการละลาย มีความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี โดยทำการเปรียบเทียบลักษณะสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) และแบคที่เรียที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมจากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ขั้นต่อไป

3.3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.3.6.1 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2.2 มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์แมล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ จะทำให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง

3.3.6.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2.2 มาทดลองใช้ในผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ โดยละลายพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05%, 0.1%, 0.5% และ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ แล้วทำการติดตามการตกตะกอนของผงโกโก้โดยเปรียบเทียบปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้น โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก สุวิมล และคณะ (2540) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นกับคาราจีแนน และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น

3.3.6.3 การทดสอบความสามารถการเกิดเจล (gelation)

ทำการละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2.2 ให้มีความเข้มข้น 0.5%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2M NaOH ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และ เกลือของโลหะ (Metal salts) ได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ และ $CuSO_4 \cdot 5H_20$ ตามลำดับ ปริมาณ 2 mg จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) แล้วจึงตรวจสอบการเกิดเจล (gelation) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น (Prasertsan และคณะ, 2006)

3.3.6.4 ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์

ดำเนินการตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Wang และคณะ (2008) และ Yun และ Park (2003) โดยสารละลายของผงถ่านกัมมันต์ (Charcoal-activated carbon) ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยมีการแปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการดูดส่วนน้ำใสชั้นบน (upper phase) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง

3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับกัวกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) จากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\% \text{ Flocculating activity} = (B\text{-}A/B) \times 100 \times \text{dilution rate}$$

หมายเหตุ

A = ค่าความขุ่นของสารละลายที่มีส่วนผสมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

B = ค่าความขุ่นของสารละลายที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในอุตสาหกรรม

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมทางอุตสาหกรรม ได้แก่ มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) มีความสามารถในการเกิดเจล (gelation) และมีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยทำการเปรียบเทียบลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคที่เรียกลุ่มที่คัดเลือกได้ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน ทำการศึกษาหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นต่อไป

3.3.8 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน

3.3.8.1 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพิ่มเติมจาก ข้อ 3.3.4

แปรผลการทดสอบต่างๆ โดยการอ้างอิงกับคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986)

เตรียมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.7 ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารชนิดต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่

3.3.8.1.1 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ nitrate reductase (Nitrate reduction)

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Nitrate broth (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาเติม 0.5% alpha-naphthylamine (ภาคผนวก ข) และ 0.8% sulfanilic acid solution (ภาคผนวก ข) อย่างละ 5 หยด อ่านผลการเปลี่ยนสีของอาหาร โดยถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรค์ ถ้าไม่ให้ผลดังกล่าว ทดสอบยืนยันโดยใส่ผงสังกะสี ผลการทดสอบจึงเป็นลบแท้จริง แต่ถ้าไม่เกิดสีแดง ผลการทดสอบรีดิวซ์ไนเตรตนั้นเป็นจริง ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.8.1.2 ความสามารถในการย่อยสลายเอสคูลิน (Hydrolysis of esculin)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Esculin (ภาคผนวก ก) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลและเกิดตะกอนสีดำ ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.8.1.3 ความสามารถในการย่อยสลายอาร์จีนีน (Hydrolysis of arginine)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Arginine (ภาคผนวก ก) แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.8.1.4 ทดสอบการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต (Production of acids from carbohydrate)

เลี้ยงเชื้อลงใน Carbohydrate fermentation broth (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิดได้แก่ น้ำตาลอะราบิโนส กลูโคส ฟรุคโตส แลคโตส แมนโนส ทรีฮาโลส ไซโลส กาแลคโตส และไรโบส เหลือ 1 หลอด ไม่ใส่เชื้อ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 2 วัน ถ้ามีกรดเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.8.1.5 ทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.8.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในอุตสาหกรรมอาหาร จากข้อ 3.3.7 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บในกลีเซอรอล 15% ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพร์เมอร์คือ 518F และ 800R เมื่อได้ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac Software Version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd., Yokohama, Japan) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.8.3 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอด์ของ 16S rRNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนว มานำเสนอต้นไม้วิวัฒนาการสร้างขึ้น โดยใช้โปรแกรม NJPLOTWIN95.EXE (Perriere และ Gouy, 1996)

3.3.9 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.3.9.1 องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม

3.3.9.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยแปรแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส และแลคโตส ตามลำดับ (Xu และคณะ, 2010) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับปริมาณของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังต่อไปนี้

3.3.9.1.1.1 วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อตกตะกอนเซลล์และโปรตีน (Lin และ Chien, 2007) แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 3 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (Kumar และคณะ, 2004) ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นปริมาตรเป็น 3 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Lin และ Chien, 2007) ทำให้น้ำหนักคงที่ในโถดูดความชื้น (desiccator) โดยรายงานน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.3.9.1.2 ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 3.3.9.1.1 โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดัดแปลงวิธีจาก Vijayendra และ Sharath Babu (2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.1.1

3.3.9.1.3 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 3.3.9.1.1 และ 3.3.9.1.2 ตามลำดับ ในการทดลองนี้ใช้ Proteose peptone, Yeast extract และ Beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ดัดแปลงวิธีจาก สุวิมล และคณะ (2540) ทำการแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 ใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ Yeast extract และ Proteose peptone โดยแปรผันปริมาณ Yeast extract เป็น 0, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งแปรผันปริมาณ Proteose peptone เป็น 0, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 ใช้แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ Yeast extract, Proteose peptone และ Beef extract ทำการแปรผันปริมาณ Beef extract เป็น 0, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อ ลิตร ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone ที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 1

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.1.1

3.3.9.2 ภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.9.2.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ได้จากข้อ 3.3.9.1 โดยแปรอุณหภูมิบ่มเชื้อเป็น 25, 30, 37, และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.1.1

3.3.9.2.2 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ได้จากข้อ 3.3.9.1 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.9.2.1 บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.1.1

3.3.9.2.3 ศึกษาการเขย่าและไม่เขย่า

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ได้จากข้อ 3.3.9.1 บ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จาก

ข้อ 3.3.9.2.1 และมีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.9.2.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีและไม่เขย่า (สุวิมล และคณะ, 2540) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.1.1

3.3.10 การศึกษารูปแบบการเจริญในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 3.3.9)

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 3.3.7 ปริมาณ 10 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ได้จากข้อ 3.3.9.1 โดยมีอุณหภูมิที่ใช้บ่ม ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น และการเขย่าที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.9.2 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Velasco และคณะ, 2006) โดยนำอะลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) ไปอบในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desiccator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30นาที เพื่อแยกเซลล์ออก (ส่วนน้ำใส นำไปสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์) นำเซลล์มาใส่ในอะลูมินัมฟอยล์ข้างต้น และทำให้แห้งในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และรายงานผลที่ได้ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และติดตามการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนออกที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนน้ำใสมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีตกตะกอน เอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2.2 จากนั้นหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ โดยรายงานผลที่ได้ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสร้างกราฟแสดงรูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติและคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง

4.1.1 แบคทีเรีย สายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551)

เลี้ยงแบคทีเรียเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 โดยถ่ายกล้าเชื้อปริมาณเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงสูตรโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยใช้ซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) และนำน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยรายงานน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

4.1.2 การคัดแยกแบคที่เรียจากผักและผลไม้ดอง

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างผักและผลไม้ดอง อันได้แก่ มะม่วงดอง พุทราดอง มะยมดอง มะกอกดอง กระเทียมดอง ผักกาดดอง และหน่อไม้ดอง จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยนำมาคัดแยกแบคทีเรียและดูการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารแข็ง

ในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) พบว่าไม่พบแลคติกแอสิดแบคทีเรียในตัวอย่างมะม่วงดอง พุทราดอง มะยมดอง และมะกอกดอง ส่วนกระเทียมดอง และผักกาดดอง พบแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 43 และ 35 สายพันธุ์ ตามลำดับ แต่แบคทีเรียจากทั้ง 2 แหล่ง ไม่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ขณะที่หน่อไม้ดอง พบแลคติกแอสิดแบคทีเรีย 56 สายพันธุ์ และพบว่ามีแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ แสดงดังในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 เมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น แล้วนำมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ หลังการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) เมื่อนำน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยรายงานในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ได้ผลดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่คัดแยกจากผักและผลไม้ดอง

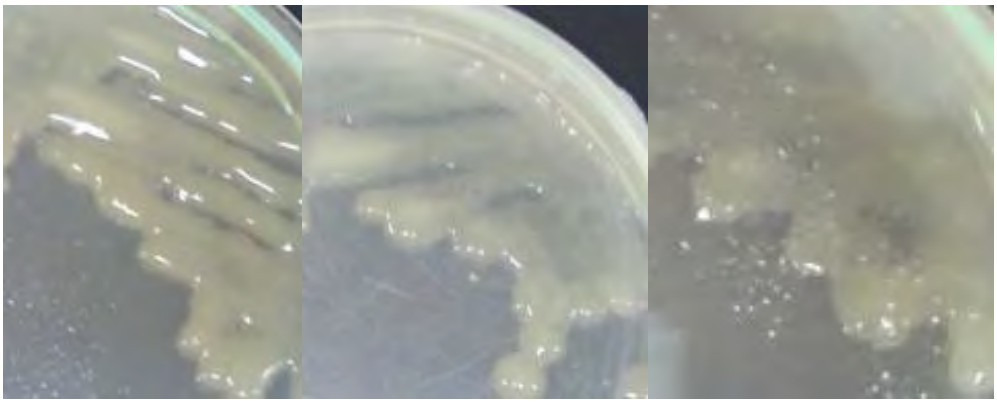
แหล่งที่มา	การให้รหัสเชื้อ	ความกว้างของโคโลนีลักษณะเมือก
หน่อไม้ดอง	LAB1 LAB2 LAB3	++ ++ +++
มะม่วงดอง พุทราดอง มะยมดอง มะกอกดอง กระเทียมดอง และผักกาดดอง	-	ไม่พบโคโลนีที่สร้างเมือกเยิ้ม

หมายเหตุ : ความกว้างของเมือกของโคโลนีแทนด้วยเครื่องหมายบวก (+) ที่วัดได้

+ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยกว่า 3.0 มิลลิเมตร

++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่า 3.0 มิลลิเมมตร แต่น้อยกว่า 3.5 มิลลิเมตร

+++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่า 3.5 มิลลิเมตร

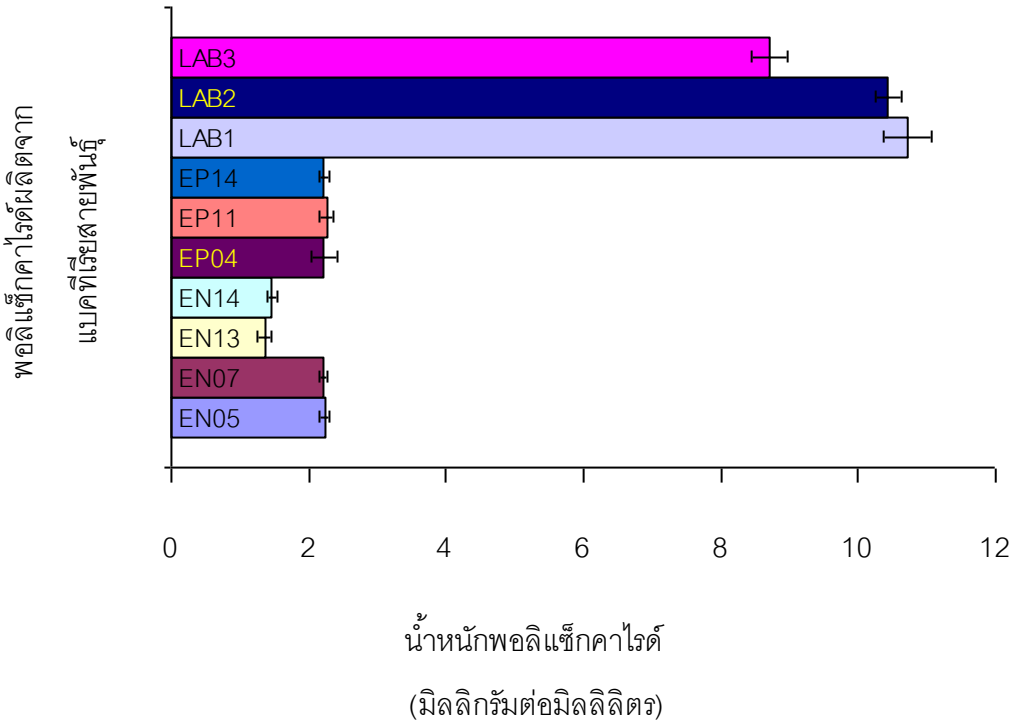


รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ที่มีเมือกเยิ้ม และมีความหนืด บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ

สายพันธุ์ (รหัสเชื้อ)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
EN05	2.23±0.07
EN07	2.22±0.07
EN13	1.36±0.10
EN14	1.47±0.07
EP04	2.23±0.20
EP11	2.26±0.10
EP14	2.23±0.07
LAB1	10.72±0.35
LAB2	10.43±0.19
LAB3	8.71±0.27

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 1.36–2.26 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 8.71–10.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่ากลุ่มแรก 4-5 เท่า โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ 10.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

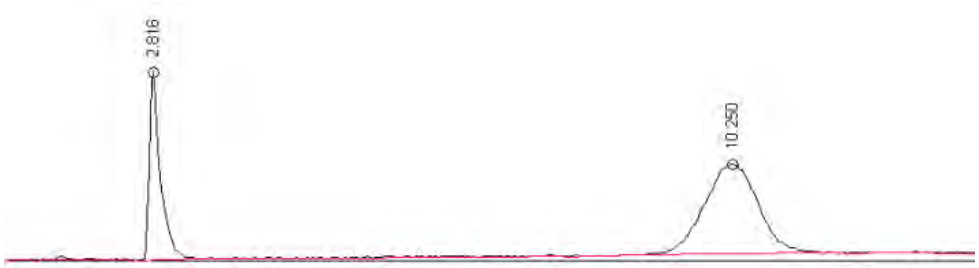
4.2.1 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ทำการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก และปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.0 ส่วนน้ำใสที่กรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอนหลังการวิเคราะห์โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.3.1.2 ได้ส่วนประกอบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

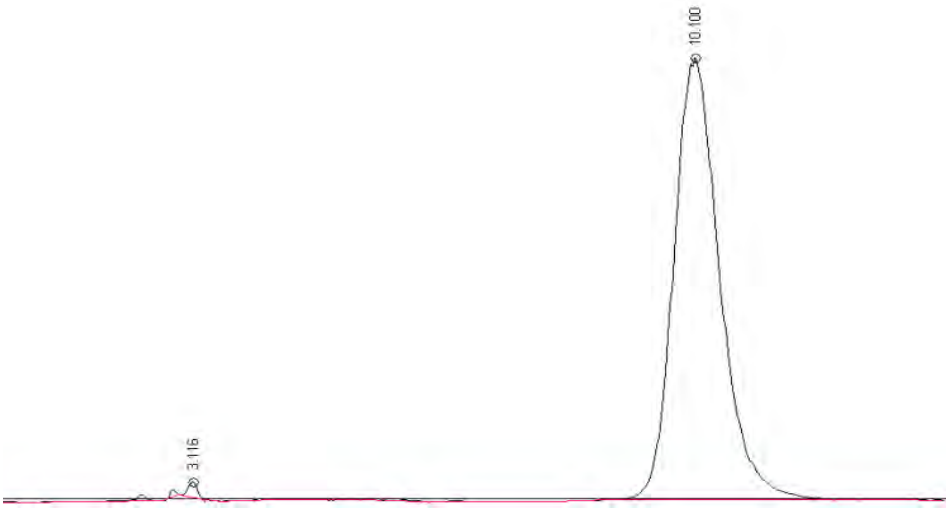
ตารางที่ 4.3 แสดงชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 หลังจากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลาย 80% โดยปริมาตรอะซิโตไนไทรล์เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
EN05	แรมโนส และ กลูโคส
EN07	แรมโนส และ กลูโคส
EN13	ไซโลส และ กาแลคโตส
EN14	ไซโลส และ กาแลคโตส
EP04	ไซโลส
EP11	ไซโลส
EP14	ไซโลส
LAB1	กลูโคส
LAB2	กลูโคส
LAB3	กลูโคส

แสดงตัวอย่างชนิดน้ำตาลของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 4.3



ก)



ข)

รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ข) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดซัลฟูริก

จากตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 และ EN14 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์

4.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.4 และแสดงตัวอย่างสมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดดังรูปที่ 4.4 4.5 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

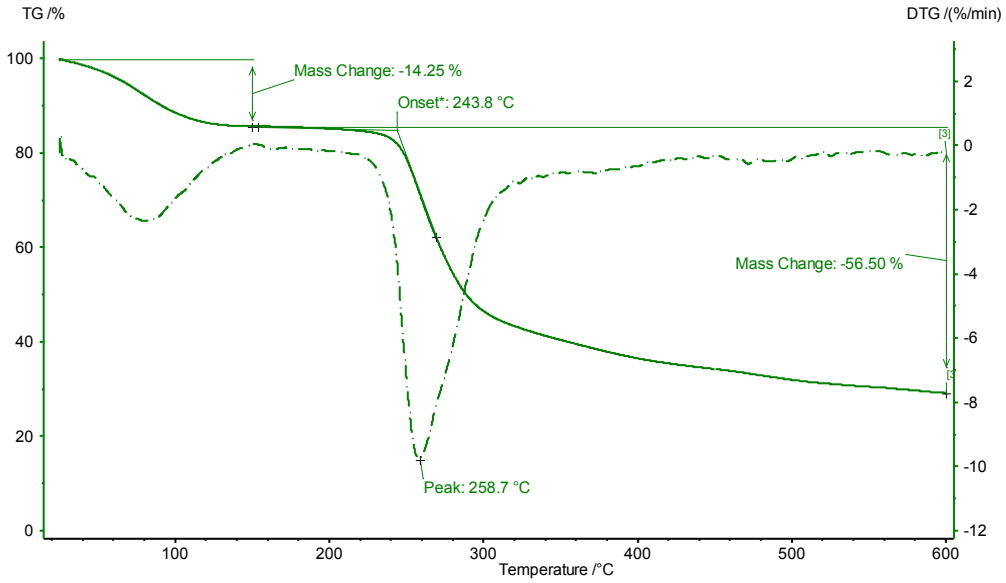
ตารางที่ 4.4 แสดงอุณหภูมิการย่อยสลายที่จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3

พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์	จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย	อุณหภูมิการย่อยสลาย (องศาเซลเซียส)
EN05	1	40-120
	2	240-330
EN07	1	40-120
	2	240-330
EN13	1	40-120
	2	220-360
EN14	1	40-120
	2	220-360

ตารางที่ 4.4 แสดงอุณหภูมิการย่อยสลายที่จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลายต่าง ๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ (ต่อ)

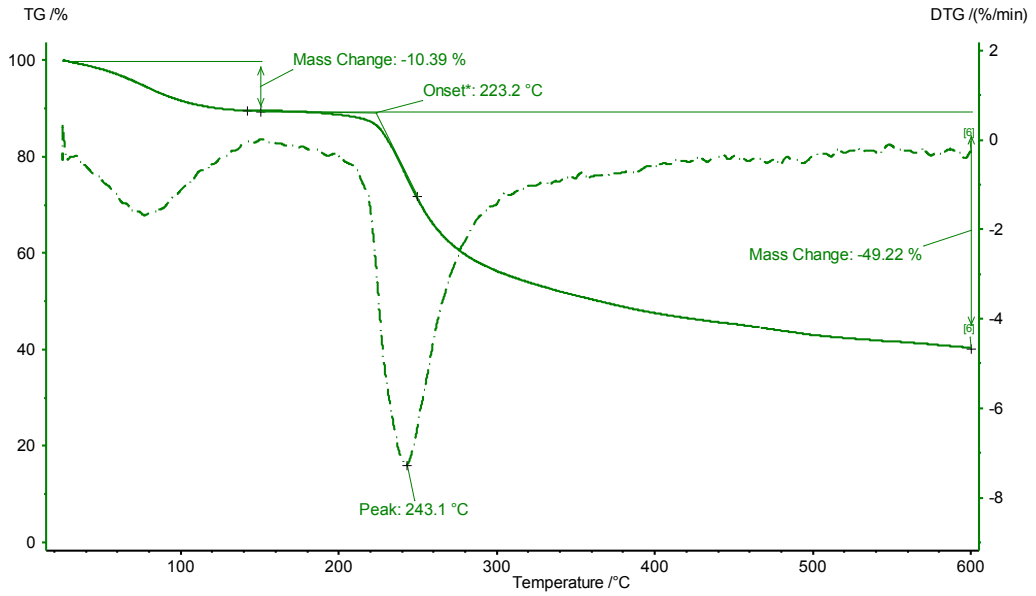
พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์	จำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย	อุณหภูมิการย่อยสลาย (องศาเซลเซียส)
EP04	1	40-120
	2	220-340
EP11	1	40-120
	2	220-340
EP14	1	40-120
	2	220-340
LAB1	1	40-120
	2	270-320
LAB2	1	40-120
	2	270-320
LAB3	1	40-120
	2	270-320

จากตารางเมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิสพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง และมีจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน เช่นเดียวกัน โดยขั้นตอนที่ 1 พบการลดลงของน้ำหนัก เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เกิดการย่อยสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากการแตกพันธะ C–O และ C–C ในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า คือ เริ่มมีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายที่ 270-320 องศาเซลเซียส



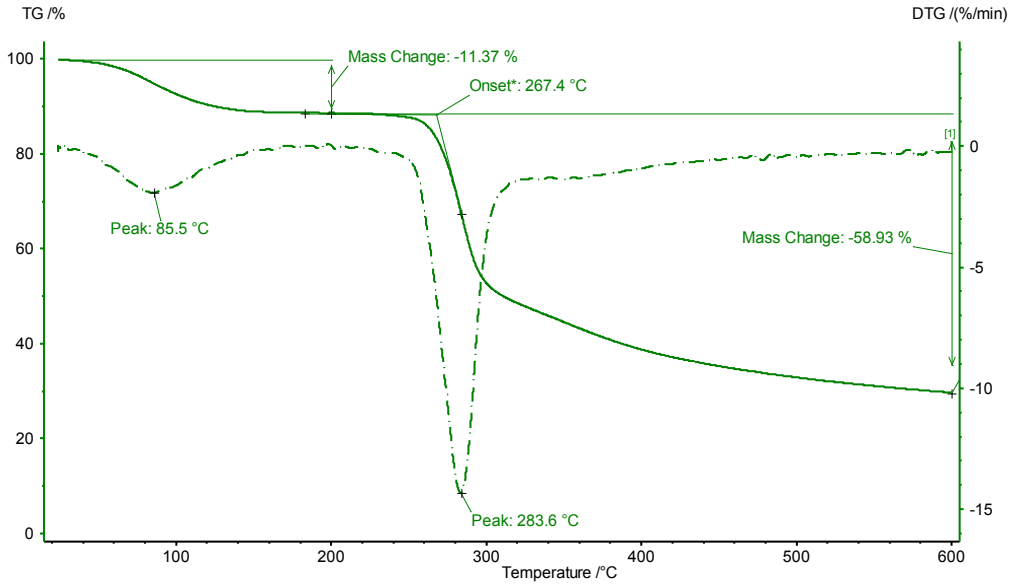
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN07 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.4 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN07 มีจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียส พบการลดลงของน้ำหนัก 14.25% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียสจนถึง 330 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 258.7 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 56.50%



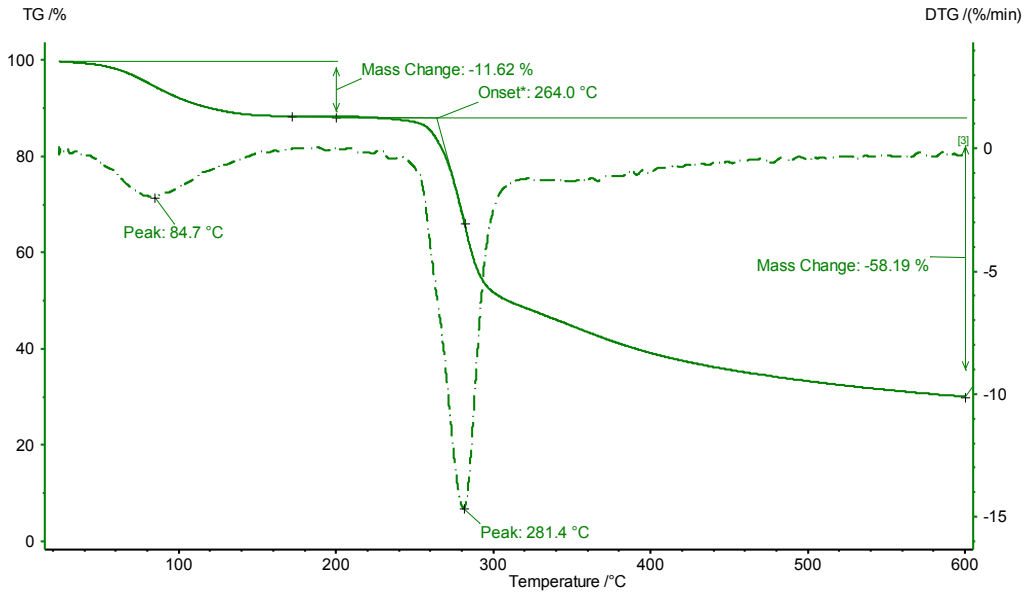
รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.5 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 มีจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียส พบการลดลงของน้ำหนัก 10.39% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียสจนถึง 340 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 243.1 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 49.22%



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.6 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียส พบการลดลงของน้ำหนัก 11.37% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียสจนถึง 320 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 283.6 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 58.93%



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB3 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.7 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB3 มีจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 พบว่าช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-120 องศาเซลเซียส พบการลดลงของน้ำหนัก 11.62% เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เริ่มมีการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียสจนถึง 320 องศาเซลเซียส และน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 281.4 องศาเซลเซียส โดยการสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ในขั้นตอนที่ 2 มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 58.19%

4.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมาวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หาเปอร์เซ็นต์ระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ต่อระยะทางของน้ำที่เคลื่อนที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) ทั้งนี้หากเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำจะแสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง ผลการทดลองได้แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ

พอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัด ของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์
EN05	32.81±1.05 %
EN07	28.45±0.90 %
EN13	65.21±1.21 %
EN14	56.90±0.11 %
EP04	35.01±0.69 %
EP11	33.04±0.11 %
EP14	45.94±1.05 %
LAB1	74.57±0.75 %
LAB2	72.33±0.75 %
LAB3	74.79±0.45 %
แซนแทนกัม	5.78±0.26%

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการทดลองพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN07 มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำสุดที่ 28% แสดงว่ามีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงสุด แต่ยังมีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำกว่าแซนแทนกัมที่เป็นชุดควบคุมมาก เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์จากต่ำไปสูง พบว่า LAB1, LAB3 < LAB2 < EN13 < EN14 < EP14 < EP04 < EN05, EP11 < EN07 ตามลำดับ

4.2.4 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 มาละลายให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ อะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอล โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม แล้วดูความสามารถการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ในน้ำและตัวทำละลายต่าง ๆ

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	
	น้ำกลั่น	อะซีโตน, เอทานอล, ไอโซโพรพานอล, เฮกเซน และเมทานอล
EN05	ละลายได้ดีที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัม	ไม่ละลายเกิดเป็นตะกอน
EN07		
EN13		
EN14		
EP04		
EP11		
EP14		

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ในน้ำและตัวทำละลายต่าง ๆ (ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	
	น้ำกลั่น	อะซีโตน, เอทานอล, ไอโซโพรพานอล, เฮกเซน และเมทานอล
LAB1	ละลายได้ดีที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัม	ไม่ละลายเกิดเป็นตะกอน
LAB2		
LAB3		
แซนแทนกัม	ละลายได้ดีที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดสูง	

จากตารางเมื่อเปรียบเทียบกับแซนแทนกัมกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ เมื่อละลายให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะมีความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัม และไม่สามารถละลายในสารละลายอะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอลได้ ทำให้เกิดเป็นตะกอน ได้เช่นเดียวกัน

4.2.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 มาละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช (น้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลือง) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.5 แล้ววิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของชั้นอิมัลซิไฟต่อระดับความสูงทั้งหมด (%Emulsifing activity) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับน้ำมันพืช (น้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตราส่วน 1:1

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	Emulsifing activity (%) (น้ำมันถั่วเหลือง)		Emulsifing activity (%) (น้ำมันมะกอก)	
	0.05% polysaccharide	0.1% polysaccharide	0.05% polysaccharide	0.1% polysaccharide
EN05	15.36±0.36	14.29±0.00	13.33±0.21	17.86±0.00
EN07	21.55±0.21	17.86±0.00	16.90±0.21	21.43±1.79
EN13	14.29±1.01	11.79±1.07	10.71±1.79	29.76±0.21
EN14	16.79±1.43	15.36±0.71	8.93±0.51	32.26±0.21
EP04	21.43±1.07	46.43±1.43	23.93±0.71	36.79±0.71
EP11	35.71±0.71	50.00±1.07	21.43±1.43	29.64±1.07
EP14	21.43±1.07	34.76±0.21	16.79±1.07	27.62±0.90
LAB1	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น
LAB2	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น
LAB3	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น
แซนแทนกัม	45.36±1.07	28.57±1.07	9.76±0.21	20.48±0.90
น้ำกลั่น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 EP11 และ EP14 ที่ความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองสูงกว่าแซนแทนกัมที่ความเข้มข้นเดียวกัน และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่ความเข้มข้นเป็น 0.05% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนใหญ่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิ

ไฟเออร์ในน้ำมันมะกอกสูงกว่าแซนแทนกัมที่ความเข้มข้นเดียวกัน ขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 เมื่อนำมาละลายน้ำ แล้วนำไปผสมกับน้ำมัน ทำให้สารละลายเกิดความไม่สม่ำเสมอ มีการแยกชั้นระหว่างน้ำกับไขมัน ทำให้ไม่สามารถวัดค่าได้ จึงไม่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

4.2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

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

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.6.1 ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 10 สายพันธุ์ ดังแสดงตารางที่ 4.8

4.2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.6.2 พบปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 10 สายพันธุ์ ดังแสดงตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ

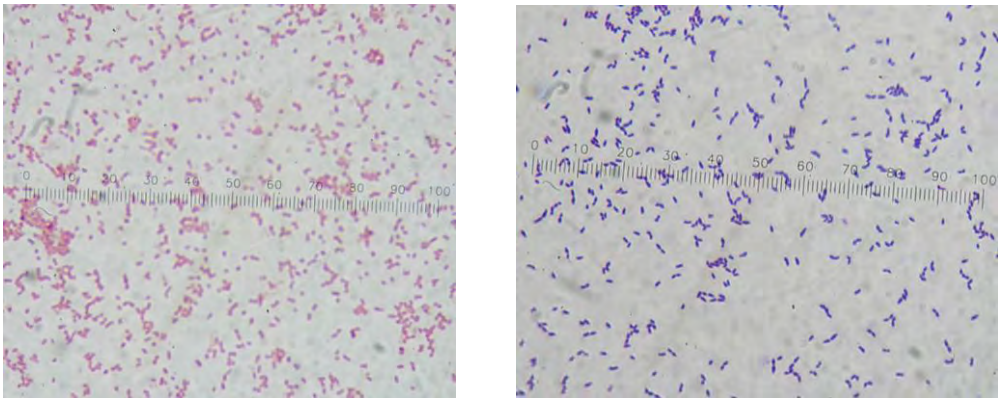
พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์
EN05	81 %	7 %
EN07	81 %	9 %
EN13	62 %	9 %
EN14	73 %	10 %
EP04	66 %	10 %
EP11	80 %	10 %
EP14	68 %	11 %
LAB1	91 %	1 %
LAB2	93 %	1 %
LAB3	85 %	1 %

4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก (morphological characteristics)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงสูตรโดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม สีขาวครีม ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม ขณะที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในสูตรอาหาร MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ติดสีแกรมลบ มี

ลักษณะรูปร่างแท่งสั้น และไม่มีการสร้างสปอร์ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างแท่งสั้น และไม่มีการสร้างสปอร์ แสดงตัวอย่างดังรูปที่ 4.8



ก) ข)

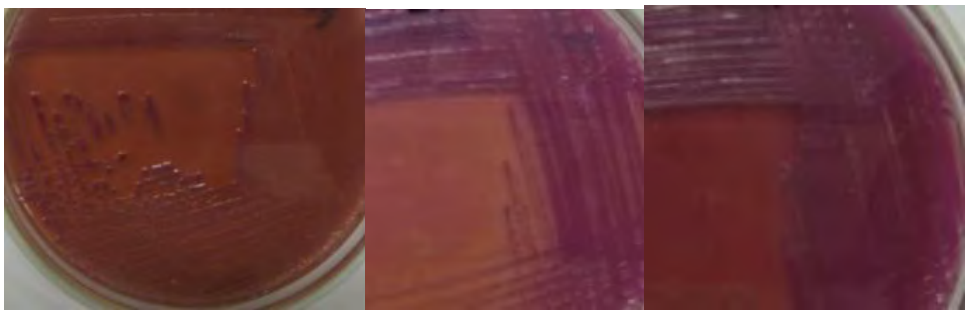
รูปที่ 4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ก) แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 กว้าง 0.8-1.0 ไมครอน ยาว 1.0-2.0 ไมครอน ข) แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 กว้าง 0.8-1.0 ไมครอน ยาว 1.5-2.0 ไมครอน

4.3.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristics and Biochemical test)

เมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยทำการทดสอบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey แสดงดังตารางที่ 4.9 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 สามารถย่อยน้ำตาลแลคโทสในอาหารได้ จึงมีโคโลนีสีชมพู และมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม แสดงตัวอย่างบางสายพันธุ์ดังรูปที่ 4.9 ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง MacConkey ได้

ตารางที่ 4.9 ผลการจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

<table>
<tr><td rowspan="2">แบคทีเรียสายพันธุ์</td><td colspan="5">สมบัติ</td></tr>
<tr><td>ลักษณะโคโลนี</td><td>การย้อมติดสีแกรม</td><td>รูปร่างของเซลล์</td><td>การสร้างสปอร์</td><td>การเจริญบนอาหารแข็ง MacConkey</td></tr>
<tr><td>EN05</td><td rowspan="6">ลักษณะกลม สีขาวครีม ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม</td><td rowspan="6">แกรมลบ</td><td rowspan="9">ลักษณะแท่งสั้น</td><td rowspan="9">ไม่สร้างสปอร์</td><td rowspan="6">เจริญและโคโลนีมีสีชมพู</td></tr>
<tr><td>EN07</td></tr>
<tr><td>EN13</td></tr>
<tr><td>EN14</td></tr>
<tr><td>EP04</td></tr>
<tr><td>EP11</td></tr>
<tr><td>EP14</td><td rowspan="6">ลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม</td><td rowspan="6">แกรมบวก</td></tr>
<tr><td>LAB1</td><td rowspan="3">ไม่เจริญ</td></tr>
<tr><td>LAB2</td></tr>
<tr><td>LAB3</td></tr>
</table>



รูปที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN14 EP11 และ EP14 บนอาหารแข็ง MacConkey

จากตารางที่ 4.9 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ และเพื่อตรวจสอบว่าจัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* หรือไม่จึงทดสอบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในอาหารได้ จึงมีโคโลนีมีสีชมพู และมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม จากนั้นทำการทดสอบทางชีวเคมีสำหรับแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ต่อไป (Buchanan และ Gibbons, 1974; Holt และคณะ, 1994) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10

ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สามารถสร้างกรดได้ และเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey พบว่า ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง MacConkey ได้ จึงทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อทดสอบว่าเป็นกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Vanderzant และ Nickelson, 1969; Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ตามลำดับ

แบคทีเรียสายพันธุ์	ผลการทดสอบทางชีวเคมี					
	Oxidase	Catalase	Motility	TSI reaction	H_2S production (TSI)	Indole production
EN05	-	+	-	A/A	-	-
EN07	-	+	-	A/A	-	-
EN13	-	+	+	A/A	-	-
EN14	-	+	+	A/A	-	-
EP04	-	+	-	A/A	-	-
EP11	-	+	-	A/A	-	-
EP14	-	+	-	A/A	-	-
LAB1	-	-	-	A/A	-	-
LAB2	-	-	-	A/A	-	-
LAB3	-	-	-	A/A	-	-

หมายเหตุ

(+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

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

จากตารางที่ 4.10 พบว่าจากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 จัดแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* อ้างอิงตาม Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) โดยพิจารณาจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EP04 EP11 และ

EP14 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ EN13 และ EN14 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter*

ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 เมื่อทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) อ้างอิงตาม Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986)

4.4 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่เหมาะสมเบื้องต้น

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) และแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง รวมทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูง มีลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมในอุตสาหกรรม ได้แก่ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีความสามารถในการละลาย มีความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี โดยลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3

แบคทีเรียสายพันธุ์	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชนิดน้ำตาล	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	อุณหภูมิการย่อยสลาย (ºC)	Emulsifing activity (%) (น้ำมันถั่วเหลือง)		Emulsifing activity (%) (น้ำมันมะกอก)		อัตรการสกัดของเหลว (%)	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	
						0.05% polysaccharide	0.1% Polysaccharide	0.05% polysaccharide	0.1% polysaccharide		อะซีโตน, เอทานอล, ไอโซโพรพานอล, เฮกเซน และเมทานอล	น้ำกลั่น
EN05	2.23±0.07	แรมโนส/กลูโคส	81	7	240-330	15.36±0.36	14.29±0.00	13.33±0.21	17.86±0.00	33±1.05	ไม่ละลายเกิดเป็นตะกอน	ละลายได้ดีที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดค่อนข้างต่ำ
EN07	2.22±0.07	แรมโนส/กลูโคส	81	9	240-330	21.55±0.21	17.86±0.00	16.90±0.21	21.43±1.79	28±0.90		
EN13	1.36±0.10	ไซโลส/กาแลคโตส	62	9	220-360	14.29±1.01	11.79±1.07	10.71±1.79	29.76±0.21	65±1.21		
EN14	1.47±0.07	ไซโลส/กาแลคโตส	73	10	220-360	16.79±1.43	15.36±0.71	8.93±0.51	32.26±0.21	57±0.11		
EP04	2.23±0.20	ไซโลส	66	10	220-340	21.43±1.07	46.43±1.43	23.93±0.71	36.79±0.71	35±0.69		
EP11	2.26±0.10	ไซโลส	80	10	220-340	35.71±0.71	50.00±1.07	21.43±1.43	29.64±1.07	33±0.11		
EP14	2.23±0.07	ไซโลส	68	11	220-340	21.43±1.07	34.76±0.21	16.79±1.07	27.62±0.90	46±1.05		
LAB1	10.72±0.35	กลูโคส	91	1	270-320	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	75±0.75		
LAB2	10.43±0.19	กลูโคส	93	1	270-320	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	72±0.75		
LAB3	8.71±0.27	กลูโคส	85	1	270-320	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	75±0.45		

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.11 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่า 4-5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) โดยมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงถึงประมาณ 8-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่าไม่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และไม่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีเท่ากับแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 แต่มีลักษณะสมบัติบางประการที่เหมาะสมซึ่งสามารถใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในสารละลายอะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอลได้ และมีความสามารถในการผลิต Glucans โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทางอุตสาหกรรมได้

ทั้งนี้จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ไม่ก่อเกิดอันตราย และมีความน่าสนใจ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มาทำการศึกษาต่อไป

4.5 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

4.5.1 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มาวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 เมื่อเติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ลงไป พบว่าไม่พบตะกอนของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์

จากสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จึงเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ขณะที่แซนแทนกัมเกิดเป็นตะกอนสีขาวซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) เมื่อนำสารละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ชนิด ไปตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีตะกอนเกิดขึ้นจำนวนมาก เป็นการยืนยันว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide)

4.5.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer)

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05% 0.1% 0.5% และ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ แล้วนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 โดยทำการติดตามการตกตะกอนของผงโกโก้ โดยเปรียบเทียบปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นหลังจากเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบการเกิดตะกอนของโกโก้กับการทดลองควบคุม คือ นมที่ไม่ได้เติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ ผลแสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนมเปรียบเทียบกับการไม่เติมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ปริมาณที่เติม (%)	ปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนม เวลา (วัน)			
		0	7	14	21
LAB1	0.05	++	++	+++	+++
	0.1	++	++	+++	+++
	0.5	++	++	+++	+++
	1	+	+	++	+++
LAB2	0.05	++	+++	+++	+++
	0.1	++	++	+++	+++
	0.5	++	++	+++	+++
	1	+	+	++	+++

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนมเปรียบเทียบกับการไม่เติมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน (ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ปริมาณที่เติม (%)	ปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนม เวลา (วัน)			
		0	7	14	21
LAB3	0.05	++	+++	+++	+++
	0.1	++	++	+++	+++
	0.5	++	++	+++	+++
	1	++	++	+++	+++
คาราจีแนน	0.05	+	++	++	+++
	0.1	-	+	++	++
	0.5	-	-	-	+
	1	-	-	-	-
ชุดควบคุม (นมที่ไม่ได้เติมสารพอลิแซ็กคาไรด์)	+++				

หมายเหตุ :

+++	=	ตะกอนมาก
++	=	ตะกอนปานกลาง
+	=	ตะกอนน้อย
-	=	ไม่เกิดการตกตะกอน

จากตารางเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 กับชุดควบคุม คือนมที่ไม่ได้เติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ได้ดีที่สุด คือเมื่อผสมกับผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05%, 0.1% และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 7-14 วัน และที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 14-21 วัน ส่วนพอลิ

แซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB2 เมื่อผสมกับผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 0-7 วัน ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 7-14 วัน และที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 14-21 วัน ขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB3 เมื่อผสมกับผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 0-7 วัน และที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.5% และ1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 7-14 วัน ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์กับคาราจีแนนพบว่า คาราจีแนนมีค่าความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์สูงกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.12

4.5.3 การทดสอบความสามารถการเกิดเจล (gelation)

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วทำการผสมกับเกลือของโลหะ (Metal salt) แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสามารถของการเกิดเจล (gelation) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ไม่มีความสามารถในการเกิดเจลได้ ขณะที่แซนแทนกัมมีความสามารถในการเกิดเจลได้เมื่อผสมกับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ และ $CuSO_4 \cdot 5H_20$ โดยที่แซนแทนกัมเกิดเจลได้ดีที่สุดเมื่อผสมกับ $CuSO_4 \cdot 5H_20$

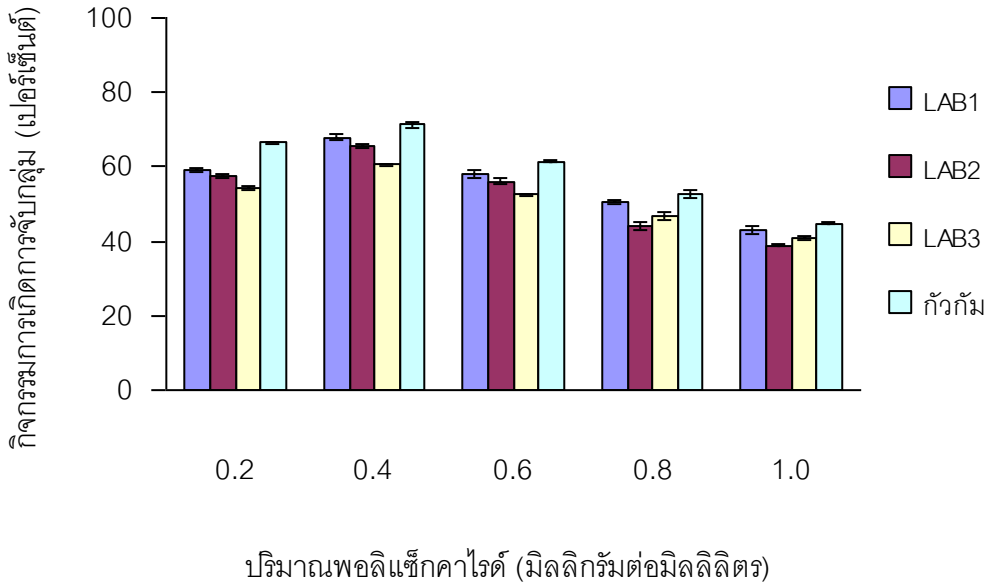
4.5.4 ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาวิเคราะห์ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ตามวิธีในข้อ 3.3.6.3 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ แล้วคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) แสดงผลดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.13 ลักษณะสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ปริมาณที่เติม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Flocculating activity			
	พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์			
	LAB1	LAB2	LAB3	กัวกัม
0.2	59.24±0.70	57.59±0.70	54.46±0.47	66.50±0.23
0.4	67.99±0.93	65.68±0.47	60.56±0.23	71.29±0.93
0.6	58.09±0.93	56.11±0.93	52.48±0.47	61.55±0.23
0.8	50.50±0.47	44.06±1.17	46.70±1.17	52.81±0.93
1.0	42.90±0.93	38.94±0.47	40.92±0.47	44.88±0.47

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.10 แสดงสมบัติด้านสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 ที่ความเข้มข้น 0.2–1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกัวกัม พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 มีความสามารถเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) และมีค่าใกล้เคียงกับกัวกัม โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าความสามารถสูงสุดในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์ (Charcoal-activated carbon) ได้ดีที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เช่นเดียวกัน โดยที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดีที่สุด

4.6 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในอุตสาหกรรม

จากการศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะสมบัติเหมาะสมทางด้านอุตสาหกรรม ได้แก่ มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) มีความสามารถในการเกิดเจล (gelation) และมีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (Flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์ แสดงผลดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3

พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ชนิดประจุพอลิแซ็กคาไรด์	ความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.1%, 0.5% และ 1% (0, 7, 14 และ 21 วัน)	การเกิดเจล	% Flocculating activity ปริมาณที่เติม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)				
				0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
LAB1	ประจุเป็นกลาง	ที่ความเข้มข้น 0.05% 0.1% และ 0.5% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 7-14 วัน ที่ความเข้มข้น 1% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 14-21 วัน	ไม่เกิดเจล	59.24±0.70	67.99±0.93	58.09±0.93	50.50±0.47	42.90±0.93
LAB2	ประจุเป็นกลาง	ที่ความเข้มข้น 0.05% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 0-7 วัน ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.5% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 7-14 วัน ที่ความเข้มข้น 1% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 14-21 วัน	ไม่เกิดเจล	57.59±0.70	65.68±0.47	56.11±0.93	44.06±1.17	38.94±0.47
LAB3	ประจุเป็นกลาง	ที่ความเข้มข้น 0.05 % สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 0-7 วัน ที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.5% และ 1% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 7-14 วัน	ไม่เกิดเจล	54.46±0.47	60.56±0.23	52.48±0.47	46.70±1.17	40.92±0.47

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความสามารถในการเกิดเจล แต่มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) และมีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ได้ และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.14 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน ทำการศึกษาหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการศึกษาต่อไป

4.7 **พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน**

4.7.1 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพิ่มเติม จาก ข้อ 4.3.2

แปรผลการทดสอบต่างๆ โดยอ้างอิงกับคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986) เพื่อหาสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ LAB1 เพิ่มเติมจากข้อ 4.3.2 โดยดูความสามารถในการผลิตเอนไซม์ nitrate reductase (Nitrate reduction) ความสามารถในการย่อยสลายเอสคูลิน ความสามารถในการย่อยสลายอาร์จีนีน การสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต และทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสโดยแสดงผลรวมกับ ข้อ 4.3.2 ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 สมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1

การตรวจทดสอบทางชีวเคมี	สมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1
ลักษณะโคโลนี	ลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม
การย้อมติดสีแกรม	แกรมบวก
รูปร่างและขนาดของเซลล์	ลักษณะแท่งสั้น
การสร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์
การเจริญบนอาหาร MacConkey	ไม่เจริญ
เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส	เจริญได้
Oxidase	-
Catalase	-
Motility	-
TSI reaction	A/A
H_2S production (TSI)	-
Indole production	-
Nitrate reduction	-
Hydrolysis of esculin	+
Hydrolysis of arginine	+

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

A/A สร้างกรดและก๊าซ

ตารางที่ 4.15 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 (ต่อ)

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต	สมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1
อะราบิโนส	-
กลูโคส	+
ฟรุคโตส	+
แลคโตส	-
แมนโนส	+
ทรีฮาโลส	-
ไซโลส	+
กาแลคโตส	+
ไรโบส	+

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (Positive)
(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (Negative)

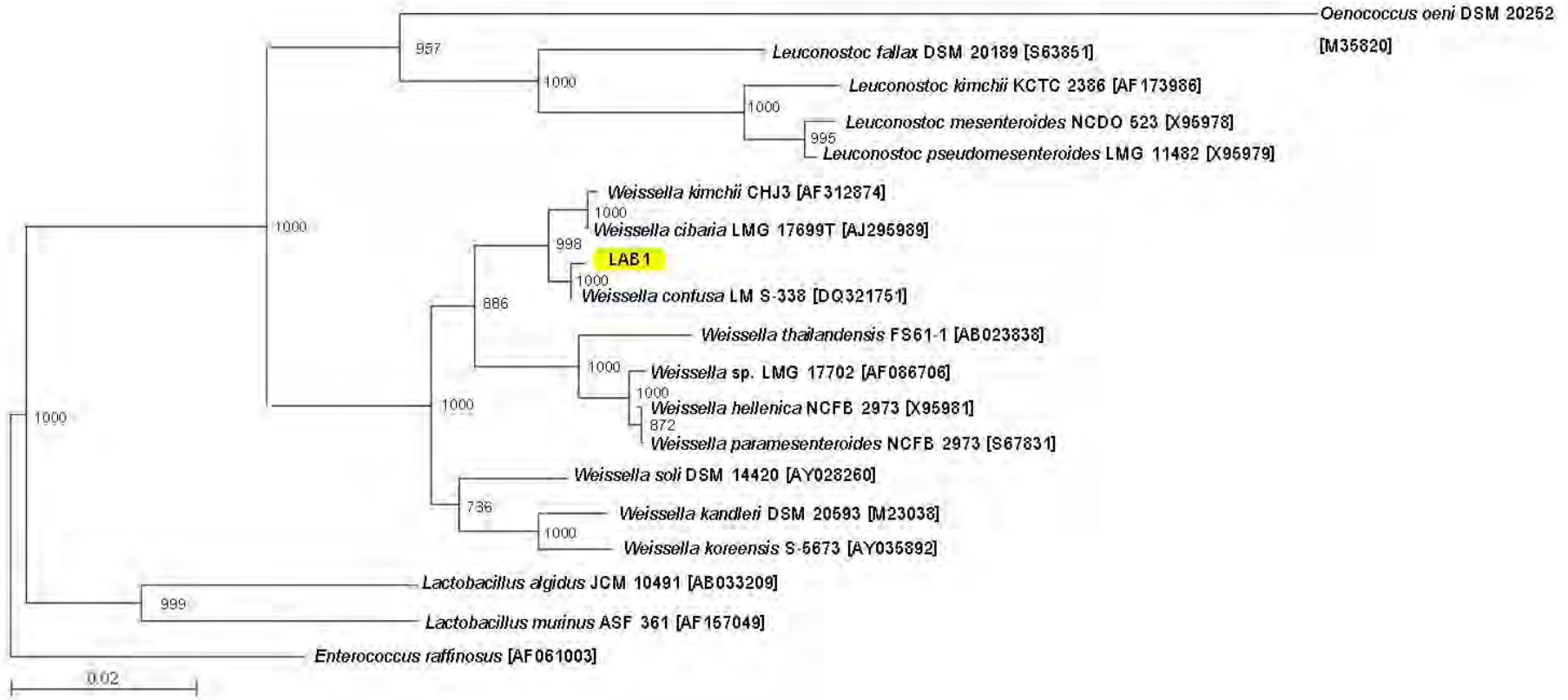
4.7.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ16S rDNA ตามวิธีในข้อ 3.3.8.2 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ความยาว 1,665 bp เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Weissella confusa* (เรียกอีกชื่อว่า *Lactobacillus confusus*) 99% และ สกุล *Weissella* sp. 98-99% ดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
Weissella confusa สายพันธุ์ LM S-338	DQ321751	99%	Shin และคณะ, 2007
Weissella confusa สายพันธุ์ NH02	AB425970	99%	Wongsuphachat และคณะ, 2010
Weissella confuse สายพันธุ์ C5-7	FJ429978	99%	Valerio และคณะ, 2009
Weissella confuse สายพันธุ์ C4-17	FJ429975	99%	Valerio และคณะ, 2009
Weissella sp. สายพันธุ์ MMZ50B	EU157913	99%	Ben Belgacem และคณะ, 2009
Weissella sp. สายพันธุ์ Uga65-2	DQ294967	98%	Jin และคณะ, 2007

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ LAB1 และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนวมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม NJplot ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) จึงสรุปว่าเชื้อนี้คือ *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) สายพันธุ์ LAB1



รูปที่ 4.11 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ 16S rDNA ของ *Enterococcus raffinosus* เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap

4.8 การศึกษาองค์ประกอบบางประการของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.8.1 องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม

4.8.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแลคโตส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.1 จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิต ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
กลูโคส	2.55±0.40
ซูโครส	10.70±0.37
ฟรักโทส	1.49±0.06

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.17 เมื่อทำการแปรผันแหล่งคาร์บอน แล้วทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด รองลงมา คือ กลูโคส และฟรักโทส ตามลำดับ พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด โดยมีน้ำหนักผลผลิตเท่ากับ 10.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

4.8.1.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสเป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 กรัมต่อลิตร ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.2 แล้วหาปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันความเข้มข้นของซูโครสเป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 กรัมต่อลิตร

ปริมาณซูโครส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
0	1.26±0.05
10	5.57±0.44
20	8.43±0.39
30	10.01±0.16
40	11.13±0.12
50	12.09±0.03
60	11.43±0.04
70	10.62±0.06

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.18 เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของซูโครส แล้วทำการเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า การใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร มีปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีค่ามากสุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 12.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกซูโครสที่ความเข้มข้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.8.1.3 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีซูโครส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ Proteose peptone, Yeast extract และ Beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 ใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ Yeast extract และ Proteose peptone โดยแปรผันปริมาณ Yeast extract เป็น 0, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร รวมทั้งแปรผันปริมาณ Proteose peptone เป็น 0, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ส่วนขั้นตอนที่ 2 ใช้ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone ที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยทำการแปรผันปริมาณ Beef extract เป็น 0, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามวิธีในข้อ 3.3.9.1.3 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.19 และตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.19 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone

ปริมาณ Yeast extract (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ Proteose peptone (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
0	0	4.55±0.03
	5	5.35±0.18
	10	6.46±0.14
	15	6.75±0.27

ตารางที่ 4.19 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone (ต่อ)

ปริมาณ Yeast extract (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ Proteose peptone (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
2.5	0	5.01±0.01
	5	5.93±0.11
	10	7.16±0.22
	15	7.49±0.05
5	0	6.48±0.02
	5	8.76±0.20
	10	8.54±0.31
	15	8.27±0.25
10	0	6.72±0.24
	5	8.94±0.71
	10	8.69±0.47
	15	8.65±0.03

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.19 พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด คือ ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone เท่ากับ 10 : 5 กรัมต่อลิตร โดยผลิตได้ 8.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone เท่ากับ 5 : 5 กรัมต่อลิตร ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 8.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าผลผลิตแตกต่างกันไม่มาก และเนื่องจากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 จึงเลือกใช้ระดับที่ต่ำลงมาแต่ให้

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงเช่นเดียวกัน คือ ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone เท่ากับ 5 : 5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.20 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่แปรผันปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract

ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ Beef extract (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
5:5	0	8.94±0.90
	5	12.44±0.42
	10	13.74±0.01
	15	14.04±0.39
	20	12.70±0.35

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.20 พบว่าปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract เท่ากับ 5 : 5 : 15 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด โดยผลิตได้ 14.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract เท่ากับ 5 : 5 : 10 กรัมต่อลิตร ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 13.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าผลผลิตแตกต่างกันไม่มาก และเนื่องจาก Beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาค่อนข้างสูง จึงเลือกใช้ระดับที่ต่ำลงมาแต่ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงเช่นเดียวกัน ดังนั้นสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 จึงเลือกใช้ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract เท่ากับ 5 : 5 : 10 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

4.8.2 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.8.2.1 อุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.8.1 โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 30 35 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามวิธีในข้อ 3.3.9.2.1 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 30 35 37 และ 40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
25	12.00±0.02
30	13.52±0.04
37	2.14±0.04
40	1.09±0.09

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.21 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าสูงสุด คือ 13.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 12.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับใช้บ่มเชื้อสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.8.2.2 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.8.1 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ ตามวิธีในข้อ 3.3.9.2.2 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.22 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ

ค่าความเป็นกรดเบส	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
5.5	12.57±0.02
6.0	13.73±0.01
6.5	13.67±0.01
7.0	13.30±0.04
7.5	12.46±0.05
8.0	12.09±0.01

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.22 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 6.0 จะมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 13.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 6.0 เป็นค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.8.2.3 ผลของการเขย่าต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิต

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.8.1 โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีและไม่เขย่า (สุวิมล และคณะ, 2540) ตามวิธีในข้อ 3.3.9.2.3 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที และไม่เขย่า

ภาวะ	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
เขย่า (200 rpm)	13.78±0.02
ไม่เขย่า	10.16±0.05

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการให้อากาศโดยการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีและไม่เขย่าพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีเมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยผลิตได้ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการเขย่า พบว่า สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เช่นเดียวกัน แต่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้อยกว่า คือ ผลิตได้ 10.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาหาภาวะเหมาะสมของอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ของ MRS ที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วน Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract ที่ 0.5 : 0.5 : 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก

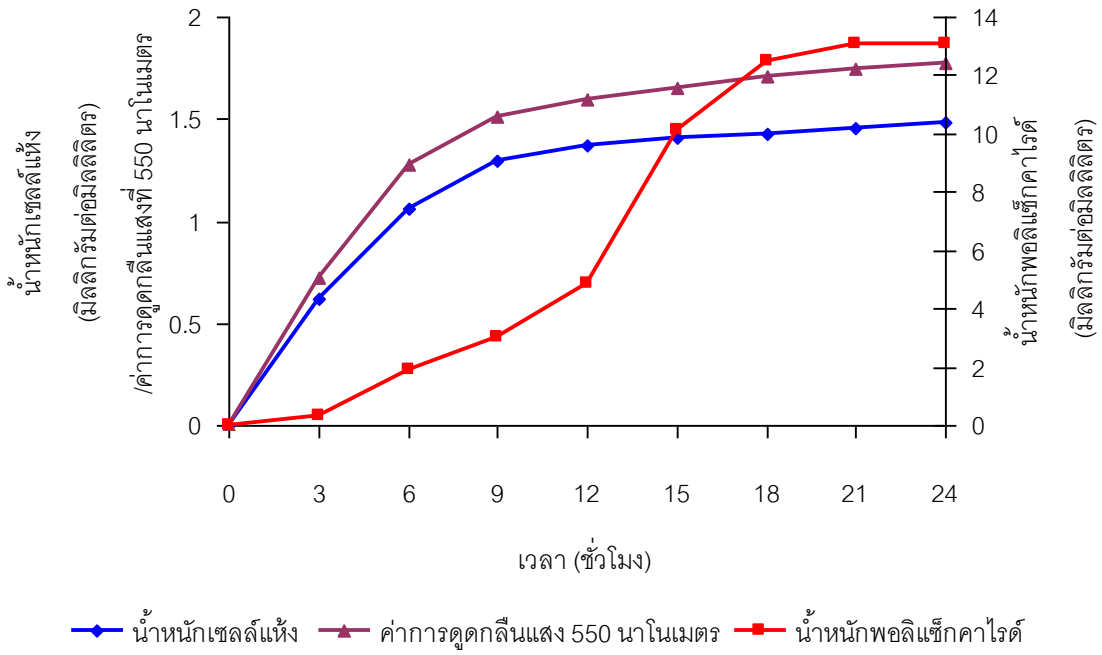
LAB1 มีค่าเท่ากับ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีปริมาณสูงกว่าอาหารสูตรเดิม 28.54% ทั้งนี้อาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยสายพันธุ์ LAB1 จะเป็นอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24 สูตรอาหารดัดแปลงใหม่และภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย สายพันธุ์ LAB1 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 10% โดยปริมาตร

ชนิด ปริมาณส่วนประกอบสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสม ต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์						น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ซูโครส	Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH	ภาวะ	เวลา (ชั่วโมง)	
50 กรัมต่อลิตร	5 : 5 : 10 กรัมต่อลิตร	30	6.0	เขย่า (200 rpm)	18	13.78

4.9 รูปแบบการเจริญในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.8)

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.8.1 ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิต ตามวิธีในข้อ 3.3.10 ผลแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 รูปแบบการเจริญและน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.8.1 หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.12 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เริ่มผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระยะทวีคูณหลังจากชั่วโมงที่ 3 โดยพิจารณารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พบว่าเป็นแบบเมตาบอไลท์ปฐมภูมิที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์พร้อมกับการเจริญ (primary metabolite) โดยมีการเจริญเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการที่สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทำให้มีการประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่ต้องการสมบัติเฉพาะตัวนั้นๆ อย่างกว้างขวาง ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาชนิด คุณสมบัติ และประสิทธิภาพของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่คัดแยกโดย สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกใหม่จากผักและผลไม้ดอง ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 1.36 – 2.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 8.71 – 10.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่ากลุ่มแรก 4-5 เท่า โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ 10.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกับที่รายงานไว้โดย Ruas-Madiedo และคณะ (2009) ที่พบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Lactobacillus reuteri* สายพันธุ์ LB121 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงถึง 10 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ในจำนวนนี้แลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เป็นที่น่าสนใจในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูง อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากผลผลิตสมบัติทางกายภาพและเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์เองก็มีความสำคัญต่อการเลือกใช้เช่นกัน จึงนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพต่อ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรด ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 และ EN14 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่าหนึ่งชนิดเป็นองค์ประกอบ เช่น แรมโนส กลูโคส ไซโลส และกาแลกโทส โดยลักษณะดังกล่าวนี้พบได้เช่นกันในจุลินทรีย์อื่น เช่น Peik และคณะ (1983) รายงานถึงเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. ว่ามีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคส แรมโนส และกาแลคทิวโรนิก แอซิด ตัวอย่างนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตามในแบคทีเรียที่ทดสอบพบว่าสายพันธุ์ EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ

LAB3 นั้นผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลเพียงชนิดเดียว โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 EP11 และ EP14 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลไซโลสเพียงตัวเดียวเป็นองค์ประกอบ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียวที่เป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Cerning (1990) พบว่าการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Pediococci* sp. ที่พบในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และไวน์สามารถผลิตเดกซ์แทรน (Dextran) ซึ่งมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว และจากการรายงานของ Sidebotham (1974) พบว่า มีแลคติกแอสิดแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนที่ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Weisella* sp.

จากการที่ในอุตสาหกรรมการเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมยาต่างต้องมีขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการให้ความร้อน (Whistler และ Be Miller, 1973) ความเสถียรต่อความร้อนของผลิตภัณฑ์จึงมีความสำคัญต่อการประยุกต์ใช้ของพอลิแซคคาไรด์ ข้อมูลในด้านนี้สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมทริก (TGA) เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง และมีจำนวนขั้นตอนกระบวนการสลาย 2 ขั้นตอนเช่นเดียวกัน โดยขั้นตอนที่ 1 พบการลดลงของน้ำหนัก เนื่องจากการสูญเสียความชื้นหรือโมเลกุลน้ำที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนที่ 2 เกิดการย่อยสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากการแตกพันธะ C–O และ C–C ในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่ากลุ่มที่มีรหัส EN และ EP คือ มีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายที่ 270-320 องศาเซลเซียส ซึ่งทนความร้อนกว่าแซนแทนกัม โดยแซนแทนกัมมีช่วงอุณหภูมิการย่อยสลายที่ 251-330 องศาเซลเซียส (Zohuriaan และ Shokrolahi, 2004) ดังนั้นด้วยสมบัติทางความร้อนข้อนี้ ทำให้สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ โดยใช้เป็นฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้ (edible film and coating) ประยุกต์ใช้กับอาหารสด ขนมบิสกิต เพื่อลดการถ่ายเทความชื้น และการเกิดออกซิเดชั่น เป็นส่วนสำคัญในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร ส่วนในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ใช้เคลือบเพื่อป้องกันการซึมผ่านของน้ำมันในระหว่างการทอด (Soaresและคณะ, 2005; Imprapai และคณะ, 2010; Williams และ Mittal, 1999) สำหรับกระบวนการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จะประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้ 1) การทำลายการดูดซับของน้ำกับพอลิแซ็กคาไรด์ 2) การกำจัดโมเลกุลของน้ำ 3) การย่อยสลายพอลิ

เมอร์ โดยการแตกพันธะ C–O และ C–C ในวงแหวนน้ำตาลเป็นผลให้เกิด CO, CO_2 และ H_2O 4) การเกิดโครงสร้างของ polynuclear aromatic และ graphitic carbon (Fried, 2000; Zamora และคณะ, 2002)

จากการที่ความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสมบัติที่สำคัญด้านหนึ่งของการใช้งานพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นจึงได้ศึกษาความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 32.81, 28.45, 65.21, 56.90, 35.01, 33.04, 45.94, 74.57, 72.33, 74.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่มีรหัส EN และ EP มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำกว่า รหัส LAB นั่นคือมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีกว่า โดยสายพันธุ์ EN07 มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำสุดที่ 28% หรือมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงสุด สมบัตินี้อาจประยุกต์ใช้ปรับปรุงการอุ้มน้ำของดินเพื่อให้ดินมีคุณภาพดีได้ (Bender และ Phillips, 2004) แม้ว่าจะต่ำกว่าแซนแทนกัมซึ่งมี 5.8% และ Tako และคณะ (1982) ที่รายงานไว้ที่ 5.5%

จากการวิเคราะห์ความสามารถการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม เมื่อละลายให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง แต่ให้ความหนืดที่ต่ำกว่าแซนแทนกัม ลักษณะนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สารละลายที่ต้องการความหนืดต่ำหรือเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์นั้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ เช่นเดียวกับ อัลเทอแนน (Alternan) ที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ และให้ความหนืดต่ำ (De Vuyst และ Degeest, 1999) และจากการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 ไปละลายในสารละลายอะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอล พบว่าไม่สามารถละลายได้ เกิดเป็นตะกอน ซึ่งเหมือนกับแซนแทนกัมและสอดคล้องกับ Kado และ Nakakita (1996) ที่รายงานว่าเดกซ์แทรนจาก *Lactobacillus confusus* ที่ใช้เป็น สารต้านเนื้องอกไม่สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อะซีโตน และ เฮกเซนได้ พอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 10 ชนิดนี้ ในเชิงกายภาพจึงสามารถใช้ในงานต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะรหัส LAB ซึ่งมีสมบัติที่ใกล้เคียง

ดังแสดงในตารางที่ 5.1 และ 5.2 คือ ละลายน้ำได้ ไม่ละลายใน แอลกอฮอล์ อะซีโตน และ เฮกเซน มีปริมาณโปรตีนต่ำ และผลิตจากกลุ่มแลคติกแอสิดเช่นเดียวกัน อาจมีประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ (Kado และ Nakakita, 1996) ทั้งนี้มีรายงานว่าการละลายและไม่ละลายของพอลิแซ็กคาไรด์นั้น ขึ้นอยู่กับการมีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้างซึ่งสามารถก่อพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของตัวทำละลาย (BeMiller และ Whistler, 1996)

จากการที่สมบัติของการเป็นอิมัลสิไฟเออร์นั้นมีบทบาทในการใช้งานอย่างมากในสารละลายเพื่อก่อการเข้าเป็นเนื้อเดียวกันของสารพวกชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ สารที่มีสมบัติดังกล่าวจะเป็นลักษณะที่พึงประสงค์ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับสารละลาย เช่น ยา เครื่องสำอางค์ และอาหาร จึงทดสอบความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอยู่ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 EP11 และ EP14 ที่ความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองสูงกว่าแซนแทนกัมที่ความเข้มข้นเดียวกัน และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 ที่ความเข้มข้นเป็น 0.05% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนใหญ่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันมะกอกสูงกว่าแซนแทนกัมที่ความเข้มข้นเดียวกัน ขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 เมื่อนำมาละลายน้ำ แล้วนำไปผสมกับน้ำมันให้สารละลายที่ไม่สม่ำเสมอ มีการแยกชั้นระหว่างน้ำกับไขมันไม่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ผลจากกลุ่มแลคติคแอซิดแบคทีเรียนี้สอดคล้องกับ สุวิมล และคณะ (2540) ที่รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตแลคติกแอสิดแบคทีเรีย *Pediococcus* sp. สายพันธุ์ AP-1 AP-3 และ *Leuconostoc* sp. สายพันธุ์ LE13-1 และ LE13-2 ไม่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันพืช มีการแยกชั้นระหว่างน้ำกับไขมัน โดย Banat และคณะ (2000) รายงานว่า อิมัลซิไฟเออร์ เป็นสารที่ช่วยให้อิมัลชั่นในอาหารคงตัว โดยจะต้องมีความสมดุลกันระหว่างหมู่ชอบน้ำ และหมู่ไม่ชอบน้ำ ที่เหมาะสม

ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3

แบคทีเรียสายพันธุ์	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชนิดน้ำตาล	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	อุณหภูมิการย่อยสลาย (ºC)	Emulsifing activity (%) (น้ำมันถั่วเหลือง)		Emulsifing activity (%) (น้ำมันมะกอก)		อัตรการสกัดของเหลว (%)	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	
						0.05% polysaccharide	0.1% polysaccharide	0.05% polysaccharide	0.1% polysaccharide		อะซีโตน, เอทานอล, ไอโซโพรพานอล, เฮกเซนและเมทานอล	น้ำกลั่น
EN05	2.23±0.07	แรมโนส/กลูโคส	81	7	240-330	15.36±0.36	14.29±0.00	13.33±0.21	17.86±0.00	33±1.05	ไม่ละลายเกิดเป็นตะกอน	ละลายได้ดีที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดค่อนข้างต่ำ
EN07	2.22±0.07	แรมโนส/กลูโคส	81	9	240-330	21.55±0.21	17.86±0.00	16.90±0.21	21.43±1.79	28±0.90		
EN13	1.36±0.10	ไซโลส/กาแลคโตส	62	9	220-360	14.29±1.01	11.79±1.07	10.71±1.79	29.76±0.21	65±1.21		
EN14	1.47±0.07	ไซโลส/กาแลคโตส	73	10	220-360	16.79±1.43	15.36±0.71	8.93±0.51	32.26±0.21	57±0.11		
EP04	2.23±0.20	ไซโลส	66	10	220-340	21.43±1.07	46.43±1.43	23.93±0.71	36.79±0.71	35±0.69		
EP11	2.26±0.10	ไซโลส	80	10	220-340	35.71±0.71	50.00±1.07	21.43±1.43	29.64±1.07	33±0.11		
EP14	2.23±0.07	ไซโลส	68	11	220-340	21.43±1.07	34.76±0.21	16.79±1.07	27.62±0.90	46±1.05		
LAB1	10.72±0.35	กลูโคส	91	1	270-320	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	75±0.75		
LAB2	10.43±0.19	กลูโคส	93	1	270-320	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	72±0.75		
LAB3	8.71±0.27	กลูโคส	85	1	270-320	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	เกิดการแยกชั้น	75±0.45		

ตารางที่ 5.2 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3

พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์	ชนิดประจุพอลิแซ็กคาไรด์	ความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.1%, 0.5% และ 1% (0, 7, 14 และ 21 วัน)	การเกิดเจล	% Flocculating activity (ปริมาณที่เติม mg/ml)				
				0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
LAB1	ประจุเป็นกลาง	ที่ความเข้มข้น 0.05% 0.1% และ 0.5% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 7-14 วัน ที่ความเข้มข้น 1% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 14-21 วัน	ไม่เกิดเจล	59.24±0.70	67.99±0.93	58.09±0.93	50.50±0.47	42.90±0.93
LAB2	ประจุเป็นกลาง	ที่ความเข้มข้น 0.05% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 0-7 วัน ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.5% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 7-14 วัน ที่ความเข้มข้น 1% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 14-21 วัน	ไม่เกิดเจล	57.59±0.70	65.68±0.47	56.11±0.93	44.06±1.17	38.94±0.47
LAB3	ประจุเป็นกลาง	ที่ความเข้มข้น 0.05 % สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 0-7 วัน ที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.5% และ 1% สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ในวันที่ 7-14 วัน	ไม่เกิดเจล	54.46±0.47	60.56±0.23	52.48±0.47	46.70±1.17	40.92±0.47

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในแง่ส่วนประกอบพื้นฐานของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละตัว เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทดสอบทั้งหมด EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 81 81 62 73 66 80 68 91 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณโปรตีน มีค่าเท่ากับ 7 9 9 10 10 10 11 1 1 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มีปริมาณน้ำตาลรวมสูงกว่า และปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่ำกว่ากลุ่มที่มีรหัส EN และ EP แสดงว่ามีความบริสุทธิ์มากกว่า สามารถนำไปใช้เป็น antitumor ได้ (Kado และ Nakakita, 1996)) Pidoux และคณะ (1988) พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus brevis* ประกอบด้วยปริมาณน้ำตาลสูงถึง 98-99 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนต่ำมากเพียง 0.045-0.065 เปอร์เซ็นต์ โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่าส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ในแง่ของน้ำตาลรวมและปริมาณโปรตีนนั้นมีความหลากหลายในพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นด้วยการอ้างอิงตาม Clinical and Pathogenic Microbiology (Howard, 1994), Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 และ EP14 จัดเป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* สกุล *Klebsiella* ยกเว้นสายพันธุ์ EN13 และ EN14 ที่จัดอยู่ในสกุล *Enterobacter* ทั้งนี้แบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำและพืช (Borman และคณะ, 1944) นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ของคนและสัตว์ แบคทีเรียวงศ์นี้ ส่วนใหญ่ เชื้อกลุ่มนี้เป็นได้ทั้งเชื้อก่อโรคจริง (True pathogen) และ เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส (Opportunistic pathogens) ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* และสกุล *Enterobacter* เป็นต้น (Shah และคณะ, 2003) แม้ว่าเชื้อกลุ่มนี้จะมีแนวโน้มในการก่อโรคในคนและสัตว์ที่ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการใช้งานในคนและสัตว์แต่ก็มีรายงานการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น เช่น มีรายงานว่า สามารถผลิตการใช้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter* sp ที่มีลักษณะข้นหนืดและมีประจุเป็นลบ ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์นี้มีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะกับคอปเปอร์ไดวาเลนท์ไอออน (Cu^{2+}) สำหรับใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้ (Shimada และคณะ, 1997) และมีรายงานว่า สามารถใช้พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 ที่เป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบในรูปสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ (Prasertsan และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้พอลิ

แซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* ในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันข้าวโพดและโทลูอีนในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Abbasi และ Amiri, 2008)

ส่วนการผลิตและการใช้ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* มีรายงานว่า *Klebsiella* sp.สายพันธุ์ S11 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีประจุลบในรูปสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ (Dermlim และคณะ, 1999) *Klebsiella oxytoca* สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีความสามารถละลายน้ำได้ ไม่มีความสามารถในการเกิดเจลเป็นสเตบิไลเซอร์หรือสารแขวนตะกอนได้ (Dlamini และคณะ, 2007)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีต่างๆ ด้วยการอ้างอิงตาม Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) เป็นที่ยอมรับกันว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ทันทีเนื่องจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียจัดเป็น Food-Grade Bacteria และได้รับการรับรองว่าเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) คือมีความปลอดภัยในการบริโภค (Mogensen และคณะ ,2002) สำหรับการผลิตและการใช้ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียนี้ เช่น มีรายงานว่า *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AP-1 and AP-3 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว (Smitinont และคณะ, 1999) ขณะที่ เฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และแรมโนส (Ruas-Madiedo และคณะ, 2009) จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารเพิ่มความข้นหนืด อิมัลซิไฟเออร์ สเตบิไลเซอร์ และสารก่อการเกิดเจลได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ (Laws และ Marshall, 2001; Ruas-Madiedo และคณะ, 2002)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะสมบัติและประสิทธิภาพการผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN05 EN07 EN13 EN14 EP04 EP11 EP14 LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม LAB มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่ากลุ่ม EN และ EP 4-5 เท่า โดยมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงถึงประมาณ 8.71–10.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ พบว่าไม่มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และไม่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีเท่ากับแบคทีเรียกลุ่ม EN และ EP ในขณะเดียวกันมีลักษณะสมบัติบางประการที่

เหมาะสมซึ่งสามารถใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในสารละลายอะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพานอล เฮกเซน และเมทานอล ผลิต Glucan โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทางอุตสาหกรรมได้ อีกทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ไม่ก่อเกิดอันตราย และมีความน่าสนใจ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 มาทำการศึกษาต่อไป

จากการวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่ามีประจุสุทธิเป็นกลาง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่รายงานไว้โดย สุวิมล และคณะ (2540) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Pediococcus* sp. สายพันธุ์ AP-1 AP-3 และ *Leuconostoc* sp. สายพันธุ์ LE13-1 และ LE13-2 เมื่อมีการเติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ลงไป แล้วไม่เกิดการตกตะกอนและมีลักษณะประจุเป็นกลาง โดยมีการเปรียบเทียบกับแซนแทนกัมซึ่งมีลักษณะเป็นประจุลบ

สำหรับความเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 กับชุดควบคุมคาราจีแนน พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB2 และ LAB3 คือเมื่อผสมกับผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05%, 0.1% และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 7-14 วัน และที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 14-21 วัน ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์กับคาราจีแนน พบว่า คาราจีแนนมีค่าความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์สูงกว่าคือ ที่ความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ 14-21 วัน และที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.5% และ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถควบคุมการตกตะกอนได้มากกว่า 21 วัน นิธิยา รัตนาปนนท์ (2539) รายงานว่า การมีคาราจีแนนในการค้ากับอาหารที่มีน้ำนมเป็นส่วนผสมหรือผลิตภัณฑ์นม เช่น ใช้ในนมช็อกโกแลต โดยช่วยให้ผงโกโก้ที่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์นมช็อกโกแลตแขวนลอยอยู่ได้ หรือใช้เป็นส่วนผสมในไอศกรีมเพื่อเป็นสารเพิ่มความคงตัวช่วยให้ส่วนผสมของไอศกรีมผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ง่าย

สุวิมล และคณะ (2540) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Pediococcus* sp. สายพันธุ์ AP-1 AP-3 และ *Leuconostoc* sp. สายพันธุ์ LE13-1 และ LE13-2 ไม่สามารถควบคุมการตกตะกอนของโกโก้ได้ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบคาราจีแนนกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ มีค่าความหนืดค่อนข้างต่ำกว่าที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กันจึงไม่เป็นสเตบิไลเซอร์ได้ดี สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์จากสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 เมื่อนำมาละลายในน้ำจะมีความหนืดค่อนข้างต่ำเช่นกัน แต่ก็ให้ผลเป็นสเตบิไลเซอร์ได้บ้าง แต่ดีไม่เท่ากับคาราจีแนนที่ความเข้มข้นเดียวกัน ทั้งนี้ระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดย Brennand และ Hendricks (1995) รายงานว่าควรเป็นประมาณ 14 วัน ส่วนไอศกรีมควรเป็นไว้ประมาณ 30 วัน ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ของสายพันธุ์ LAB ที่แยกได้จึงเป็นตัวสเตบิไลเซอร์ในระดับปานกลางเท่านั้น

ส่วนความสามารถการเกิดเจล (gelation) กับเกลือของโลหะ เมื่อเปรียบเทียบกับแซนแทนกัมพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 ไม่มีความสามารถในการก่อเจล Sutherland (1994) รายงานว่า ความสามารถในการก่อเจลเกิดจากการจับกับไอออนของเกลือโลหะโดยขึ้นกับ โครงสร้าง ประจุ และปริมาณประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ รวมทั้งการเข้าไปถึงและจับกันอย่างจำเพาะได้ง่ายระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์กับไอออนของเกลือโลหะ ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่ามีประจุสุทธิเป็นกลาง เมื่อนำมาทดสอบภายใต้ภาวะนี้ จึงไม่สามารถจับกับเกลือของโลหะชนิดต่างๆได้ ทำให้ไม่สามารถก่อเจลได้

ในด้านความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ LAB1 LAB2 และ LAB3 พบว่า ต่างมีความสามารถเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) และมีค่าใกล้เคียงกับกัวกัม โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าความสามารถสูงสุดในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์ได้ดีที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ LAB1 มีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดีที่สุด ซึ่งการมีความสามารถจับกลุ่มได้นั้น Salehizadeh และ Shojaosadati (2001) อธิบายว่า พอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้เพิ่มบริเวณดูดซับ เกิดการสร้างสะพานเชื่อม (bridging mechanism) ระหว่างอนุภาคแขวนลอยอย่างแข็งแรง จึงให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูง จากนั้นพบว่าความสามารถก่อการจับกลุ่มจะค่อยๆ ลดลงที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น Lim และคณะ (2007) อธิบายว่าเกิดจากสารก่อการจับกลุ่มที่มากเกินไป เกิดการแพร่กระจายอย่างไม่สมบูรณ์และทั่วถึง ทำให้

อนุภาคแขวนลอยที่อยู่รอบๆ สารก่อการจับกลุ่มเท่านั้น ที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มกัน สอดคล้องกับรายงานของ Wang และคณะ (2008) พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus kefiranofaciens* สายพันธุ์ ZW3 มีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากความสามารถก่อการจับกลุ่มจะค่อยๆ ลดลงที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น Yun และ Park (2003) พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ CP912 ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีสมบัติเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับกับผงถ่านกัมมันต์ ได้ดีกว่า แซนแทนกัม โลคัสบีนกัม กัมอารบิก และกัวกัม จะเห็นได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทดสอบมีคุณสมบัติข้อนี้เทียบเคียงได้กับสารก่อการจับกลุ่มที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่กล่าวมาข้างต้นได้

โดยสรุปพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1, LAB2 และ LAB3 ไม่มีความสามารถในการเกิดเจล แต่มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) และมีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ได้ และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

โดยการมีสมบัติที่ต่างกันของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิด ทำให้นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ได้ไม่เหมือนกัน ดังพอลิแซ็กคาไรด์ทางอุตสาหกรรมเช่น วีแลน(Welan) ผลิตจาก *Alcaligenes* sp. ไม่มีคุณสมบัติในการเป็นสารก่อเจล แต่ละลายน้ำได้ มีความหนืดสูง และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง ทนความร้อน จึงเหมาะในการนำไปใช้ในการขุดเจาะน้ำมัน ใช้เป็นสารเชื่อมต่อในการก่อสร้าง และสารเพิ่มความข้นหนืดในอุตสาหกรรมสี (Othmer, 2007) ส่วนกัมอารบิก (Gum Arabic) สามารถละลายน้ำได้ดีมากในระดับความเข้มข้นสูงถึง 50% สารละลายที่ได้มีความหนืดต่ำ ไม่ละลายในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัว สารอิมัลซิไฟเออร์ และสารยึดเกาะในยาอม ลูกอม และขนมหวานต่างๆ ที่ไม่ต้องการความเหนียวหนืด โดยใช้ที่ความเข้มข้น 10-40% ขึ้นอยู่กับลักษณะของผลิตภัณฑ์นั้น (Nieto และ Andon, 2009; Belitz และคณะ, 2009; Zallie, 1988) และโลคัสบีนกัม (Locust bean gum) ไม่ละลายในน้ำเย็น ละลายในน้ำร้อนที่มากกว่า 80 องศาเซลเซียส ไม่มีความสามารถในการเกิดเจล ต้องนำมาผสมกับแซนแทนกัมจึงจะทำให้เกิดเจลได้ มีความสามารถอุ้มน้ำ และเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ (Pedersen, 1980; Jenita และคณะ, 2010) จะเห็นได้ว่าการมีสมบัติที่ต่างกัน นำไปใช้ได้ไม่เหมือนกัน เพียงแต่ต้องรู้ว่าคุณสมบัตินั้นมีการใช้งานด้านใดที่เหมาะสม เช่นเดียวกับการทดลองนี้ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มีลักษณะสมบัติที่ดีที่สุด คือ เป็นเชื้อไม่ก่อโรค ผลิตกลูแคนได้ในปริมาณสูง มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ดี มีความหนืดต่ำ ไม่สามารถละลายในสารละลายอะซีโตน เอทานอล ไอโซโพรพา

นอล เฮกเซน และเมทานอล มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง มีความสามารถในการเป็นสเตบิไลเซอร์ และมีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ใช้เป็นสารเคลือบผิว สารสเตบิไลเซอร์ในผลิตภัณฑ์นม หรือสารก่อการจับกลุ่มในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม เป็นต้น จากนั้นนำแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธานต่อไป

เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 ทางอนุกรมวิธาน โดยทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมจากข้างต้น อ้างอิงตาม Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986) รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Weissella* (ชื่อเดิมเรียกว่า *Lactobacillus*) และจาก phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Weissella confusa* สายพันธุ์ LM S-338 99% และ *Weissella confusa* สายพันธุ์ NH 02 99% ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LAB1 เป็นแบคทีเรีย *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) จึงเรียกแบคทีเรียนี้ว่า *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ไม่ต้องการอากาศในการเจริญหรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนจากซูโครส (Kandler และ Weiss, 1984; Kandler และ Weiss, 1986) สำหรับการผลิตและการใช้ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย *Weissella confusa* นี้ มีรายงานว่า *Weissella confusa* สายพันธุ์ E392 มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (linear dextran) ซึ่งสามารถใช้ในอุตสาหกรรมได้ โดยอาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงแทนการผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* (Maina และคณะ, 2008) การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Weissella confusa* สามารถนำไปปรับปรุงในผลิตภัณฑ์ขนมปัง wheat sourdough (Katina และคณะ, 2009) ทั้งนี้ *Weissella confusa* ยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ เช่น ใช้เป็น Antitumor, เป็นสารลดคลอเรสตอรอล เป็นสารช่วยปรับปรุงการไหลของเลือด และทำหน้าที่เป็นเม็ดตัวกลางเล็กๆ (microcarrier) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (De Vuyst และคณะ, 2001)

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1 พบว่า เมื่อหาภาวะเหมาะสมของอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ MRS ที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วน Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract มีค่าเท่ากับ 0.5 : 0.5 : 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตได้ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสูตรอาหารดัดแปลงใหม่สูงกว่าอาหารสูตรเดิมคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 28.54%

เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารดัดแปลงใหม่กับอาหารสูตรเดิม พบว่า เชื้อ *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1 ยังคงใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเหมือนเดิม โดยทำให้การเจริญของเซลล์สูงสุดและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นสับสเตรทจำเพาะ specific substrates ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นี้ ซึ่งสอดคล้องกับ การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Weissella confusa* สายพันธุ์ NH 02 (Wongsuphachat และคณะ, 2010) โดยน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความสำคัญในการให้พลังงานสำหรับการเจริญของเซลล์และเชื้อใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ทั้งนี้ซูโครสยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกอีกด้วย (Degeest และ De Vuyst, 2000; Prasertsan และคณะ, 2008)

ในอาหารดัดแปลงใหม่ที่มีซูโครสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการเจริญของเซลล์สูงสุดและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด โดยผลิตได้ 12.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่างจากอาหารสูตรเดิมที่มีซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ผลิตได้เพียง 11.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากต้องมีปริมาณน้ำตาลมากพอ ถึงจะสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมากเกินพอ จะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ค่อนข้างต่ำลง เนื่องจากเชื้ออาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งอาจเป็นเพราะมีปริมาณของแข็ง (Total solid) มากเกินไป (Cerning, 1990)

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลงใหม่ พบว่า ปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract เท่ากับ 5 : 5 : 10 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด ต่างจากอาหารสูตรเดิมที่มีปริมาณ Yeast extract : Proteose peptone : Beef extract เท่ากับ 5 : 10 : 10 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าอาหารดัดแปลงใหม่มีปริมาณ Proteose peptone ลดลงเป็นครึ่งหนึ่ง ทำให้ลดต้นทุนในการผลิตได้ เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนนี้มีราคาค่อนข้างสูง สำหรับการผลิตยังคงจำเป็นต้องมีสารทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญที่ส่งผลถึง 94% ที่เชื้อใช้ในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Kimmel และ Roberts , 1998) สอดคล้องกับ สุวิมล และคณะ (2540) พบว่า การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Pediococcus* sp. สายพันธุ์ AP-1 AP-3 และ *Leuconostoc* sp. สายพันธุ์ LE13-1 และ LE13-2 ยังคงจำเป็นต้องมีสารทั้ง 3 ชนิด โดยการที่เชื้อต้องการสารไนโตรเจนเหล่านี้ในปริมาณสูง เนื่องมาจากลักษณะการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตไปพร้อมกับการเจริญ (Growth-associated) ทำให้เชื้อเติบโตได้มากทำให้ได้ปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลงใหม่และอาหารเดิม คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน เนื่องจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส โดยผลิตพร้อมกับการเจริญ (Growth-associated) จึงทำให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงเนื่องจากเชื้อเจริญได้ดี (Salminen และ Wright, 1993)

ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่เท่ากับ 6.0 โดยมีรายงานว่าช่วงค่าความเป็นกรดเบสระหว่าง 6.0-7.5 มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Lawson และ Sutherland, 1978)

เมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดี โดยผลิตได้ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีการให้อากาศ (Cerning, 1990)

เนื่องจากมีรายงานทางเศรษฐกิจว่า แลคติกแอสิดแบคทีเรียทางการค้า ต้องมีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วง 10-15 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร (Welman และ Maddox, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับสายพันธุ์ LAB1 ที่ผลิตได้ 13.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ LAB1 สามารถผลิตเพื่อใช้ในทางการค้าได้ดี

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของ *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงใหม่จากข้างต้น พบว่า สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์พร้อม ๆ ไปกับการเจริญ จึงสรุปได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตเป็นสารเมทาบอไลท์แบบปฐมภูมิ (Primary metabolite) โดยเริ่มมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงเมื่อเชื้อเจริญในระยะ stationary phase และเข้าสู่ภาวะคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อ 18 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับ Wongsuphachat และคณะ (2010) ที่รายงานว่า *Weissella confusa* สายพันธุ์ NH 02 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แบบปฐมภูมิและผลิตได้สูงสุดเมื่อเชื้อเจริญในระยะ early stationary phase

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาลักษณะพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในด้านต่างๆให้มากกว่านี้ เช่น หาน้ำหนักโมเลกุล ศึกษาโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ในงาน หรืออุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากขึ้น
2. ควรศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของ *Weissella confusa* สายพันธุ์ LAB1 โดยการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรม เช่น ปรับปรุงในระดับพันธุกรรม โดยการกลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV หรือสารเคมีบางชนิด เช่น NTG หรือ EMS เป็นต้น เพื่อนำไปใช้เพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2539. เคมีอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

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

สุวิมล กีรติพิบูล, สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ ฐิตาภา เขียวขจี. 2540. การผลิต Exopolysaccharides โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติคและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร รายงานผลการวิจัย ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

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

Amanullah, A., Tuttiett, B., and Nienow, A.W. 1998. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. Biotechnology and Bioengineering 57 : 198-210.

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

Axelsson, L.T. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In Salminen, S. and Wrigth, A.V. (eds.). Lactic acid bacteria pp. 1-64. New York : Marcel Dekker.

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

Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology 53 : 495-508.

Bekers, M., et al. 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry 40 : 1535-1539.

Belitz, H.D., Grosch, W., and Schieberle, P. 2009. Food chemistry Berlin : Springer.

BeMiller, J.N. 1996. Polymeric Materials Encyclopedia In Salamone, J.C. (ed.). p. 2892 Florida : CRC Press.

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

Ben Belgacem, Z., Dousset, X., Prevost, H., and Manai, M. 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. Archives of microbiology 191 : 711-720.

Bender, J., and Phillips, P. 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. Bioresource Technology 94 : 229-238.

Bohn, J.A., and BeMiller, J.N. 1995. (1$\rightarrow$3)-β-D-Glucan as biological response modifiers: A review of structure–functional activity relationships. Carbohydrate Polymers 28 : 3-14.

Borman, E.K., Stuart, C.A., and Wheeler, K.M. 1944. Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*. Journal of Bacteriology 48 : 351-367.

Bouzar, F., Cerning, J., and Desmazeaud, M. 1997. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. Journal of Dairy Science 80 : 2310-2317.

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

Brennand, C.P., and Hendricks, D.G. 1995. Food strorage in the home USA : Utah State university.

Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's manual of Determinative Bacteriology 8th ed. United States of America : Waverly press.

Calazans, G.M.T., Lopes C.E., Lima, R.M.O.C., and de Franc, F.P. 1997. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnology Letters 19 : 19-21.

Cascone, M.G., Barbani, N., Cristallini, C., Giusti, P., Ciardelli, G., and Lazzeri, L. 2001. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 12 : 267–281.

Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 87 : 113-130.

Cerning, J. 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Lait 75 : 463–472.

Cerning, J., and Marshall, V.M.E. 1999. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. Recent Results and Developments in Microbiology 3 : 195-209.

Cerning, J., et al. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partia structure analysis of the polymer. Applied and Environmental Microbiology 60 : 3914-3919.

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

Congregado, F., et al. 1985. Preliminary studies on the production and composition of the extracelluler polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp EPS-5028. Biotechnology Letters 7 : 883–888.

Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., and Sutherland, I.W. 1994. Alginate production from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: Production and properties. Microbiology 140 : 1125.

Crescenzi, V. 1995. Microbial polysaccharides of applied interest: On going research activities in Europe. Biotechnology Progress 11 : 251-259.

Christiansen, P.S., Madeira, A.I.M.R., and Edelstein, D. 1999. The use of ropy milk as stabilizer in the manufacture of ice cream. Milchwissenschaft 54 : 138-140.

Dassy, B., Stringfellow, W.T., Lieb, M., and Fournier, J.M. 1991. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in semi-synthetic medium. Journal of General Microbiology 137 : 1155.

Degeest, B., and De Vuyst, L. 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus*

thermophilus LY03 and modelling of bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Applied and Environmental Microbiology 65 : 2863-2870.

Degeest, B., and De Vuyst, L. 2000. Correlation of activities of the enzymes a-phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. Applied and Environmental Microbiology 66 : 3519-3527.

Degeest, B., Vaningelgem, F., and De Vuyst, L., 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics and process engineering of heteropolysaccharides production by lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11 : 747-758.

De Philippis, R., et al. 2000. Morphological and biochemical characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* from the Pasteur Culture Collection. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 655-661.

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

De Souza, A.M., and Sutherland, I.W. 1994. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. Journal of Applied Bacteriology 76 : 463.

De Vuyst, L., and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 23 : 153–177.

De Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F., and Degeest, B., 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11 : 687-707.

Dlamini, A.M., Peiris, P.S., Bavor, J.H., and Kailasapathy, K. 2007. Characterization of the exopolysaccharide produced by a whey utilizing strain of *Klebsiella oxytoca*. African Journal of Biotechnology 6 : 2603-2611.

Du, Y., Kong, Z., and Li, H. 1994. Studies on saparation and structure of lacquer polysaccharides. Acta Polymerica Sinica 3 : 301-306.

Duboc, P., and Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal 11 : 759-768.

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

Dumitriu, S. 1998. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility New York : Marcel dekker Inc.

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

Farres, J., Caminal, G., and Lopez-Santin, J. 1997. Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-174. Applied Microbiology and Biotechnology 48 : 522.

Freitas, F., et al. 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. Bioresource Technology 100 : 859-865.

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

Garcia-Garibay, M., and Marshall, V.M.E. 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Journal of Applied Bacteriology 70 : 325-328.

Gassem, M.A., Schmidt, K.A., and Frank, J.F. 1997. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Journal of Food Science 62 : 171.

Graber, M., Morin, A., Duchiron, F., and Monsan, P.F. 1988. Microbial polysaccharides containing 6-deoxy sugar. Enzyme and Microbial Technology 10 : 198.

Gumargalieva, K.Z., Shipunova, O.V., Zaikov, G.E., Jubanov, B.A., and Moshkevitch, S.A. 1998. About biodegradation of polymer compounds based on crosslinked dextrans. Polymer New York : Nova Science Publishing.

Halleck, F.E. 1967. Polysaccharides and methods for the production thereof U.S. Patent 3,301,848.

Harlan, R.E., and Roberts, F.E. 1973. Thermogravimetric analysis apparatus U.S. Patent 3,902,354.

Harrah, T., Panilaitis, B., and Kaplan, D. 2006. Microbial Exopolysaccharides. Prokaryotes 1 : 766–776.

Hicks, K.B. 1988. High-performance liquid chromatography of carbohydrates. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 46 : 17-72.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. Baltimore : Williams and Wilkins.

Howard, B.J. 1994. Clinical and pathogenic microbiology 2nd ed. St. Louis : Mosby-year book Inc.

Huber, U., and Majors, R.E. 2007. Principles in preparative HPLC Germany : Agilent Technologies Inc.

Iizuka, M., Yamaguchi, H., Ono, S., and Minaminra, N. 1993. Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support Sm-10. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 57 : 322-324.

Imprapai, K., Kerdchoechuen, O., and Laohakunjit, N. 2010. Development of Edible Film for Vapor Barrier Properties as Coating Material in Biscuit Product. Journal of Agricultural Science 41 : 605-608.

Jana, A.K., and Ghosh, P. 1997. Stimulation of xanthan production by *Xanthomonas compestris*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13 : 261-264.

Jansson, R.E., Lindberg, B., and Sandford, P.I.A. 1983. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. Carbohydrate Research 124 : 135-223.

Jeanes, A., et al. 1954. Characterisation and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. Journal of the American Chemical Society 76 : 5041-5052.

Jenita, J.J.L., Vijaya, K., Suma, R., Bincy, R., and Siddiqca, A. 2010. Formulation and evaluation of compression coated tablets of mesalazine for colon delivery. International Journal of PharmTech Research 2 : 535-541.

Jiang, Z., Tominaga, T., Kamataa, K., Osada, Y., and Gonga, J.P. 2006. Surface friction of gellan gels. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 284-285 : 56-60.

Jin, L., et al. 2007. Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. Journal of Applied Microbiology 102 : 1107-1115.

Jonas, R., and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. Polymer Degradation and Stability 59 : 101-106.

Kado, H., and Nakakita, Y. 1996. Method for preparing an antitumor dextran synthetase from Lactobacillus confuses U.S. Patent 5,484,715.

Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D.A., and Skaracis, G.N. 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xantomonas campestris* grown in molasses. Process Biochemistry 39 : 249-256.

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

Kandler, O., and Weiss, N. 1984. Regular, non-sporing Gram-positive rods. In Sneath, P.H.A., Mair, M.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds.). Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9th ed. pp. 1208-1260. Baltimore : Williams and Wilkins.

Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Regular, non-sporing Gram-positive rods. In Sneath, P.H.A., Mair, M.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds.). Bergey's manual of Determinative Bacteriology pp. 1208-1234. Baltimore : Williams and Wilkins.

Katina, K., et al. 2009. In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. Food Microbiol 26 : 734-743.

Kennedy, J.F. 1989. Carbohydrates Oxford : Oxford University Press.

Kennedy, J.F., and White, C.A. 1983. Bio-active carbohydrates pp. 116-180. Chichester : Ellis Horwood.

Kimmel, S.A., Roberts, R.F., and Ziegler, G.R. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semi-defined medium. Applied Environmental Microbiology 64 : 659-664.

Korakli, M., and Vogel, R.F. 2006. Structure/function relation-ship of hompolysaccharides producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. Applied Microbiology and Biotechnology 71 : 790-803.

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

Kwon, G.S., et al. 1996. Rheological properties of extracellular polysaccraride, pestan, produced by *Pestalotiopsis* sp. Biotechnology Letters 18 : 1465-1470.

Lacroix, C., Le Duy, A., Noel, G., and Choplin, L. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnology and Bioengineering 27 : 202.

Lai, V.M.F., and Lii, C. 2004. Role of Saccharides in Texturization and Functional Properties of Foodstuffs In Chemical and Functional Properties of Saccharides. Florida : CRS Press.

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

Lawson, C.J., and Sutherland, I.W. 1978. Polysaccharide. In Rose, A.H. (ed.). Economic microbiology. Polysaccharides in primary products of metabolism vol. 2. pp. 327-392. New York : Academic Press Inc.

Lee, B. 1997. Fundamentals of Food Biotechnology New York : Academic Press.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. 1993. Principle of Biochemistry 2nd ed. New York : Worth.

Lim, D.J., Kim, J.D., Kim, M.Y., Yoo, S.H., and Kong, J.U. 2007. Physicochemical properties of the exoploysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. KCCM10036. Journal of Microbiology and Biotechnology 17 : 979-984.

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

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

Linton, J.D. 1994. The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. FEMS Microbiology Reviews 75 : 1.

Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N. 1999. Fermentedmilks: range of products. In Robinson, R.K. (ed.). Encyclopedia of Food Microbiology pp. 774-784. San Diego : Academic Press.

Lopez, E., Ramos, I., and Sanroman, M.A. 2003. Extracellular polysaccharides production by *Arthrobacter viscosus*. Journal of Food Engineering 60: 463-467.

Maina, N.H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., and Virkki, L. 2008. NMR spectroscopic analyses of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. Carbohydrate Research 343 : 1446-1455.

Majumder, A., Singh, A., and Goyal, A. 2009. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. Carbohydrate Polymers 75 : 150-156.

Manandhar, S., Vidhate, S., and D'Souza, N. 2009. Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers Carbohydrate Polymers 78 : 794-798.

Manresa, A., Espuny, M.J., Guinea, J., and Comelles, F. 1987. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910. Applied Microbiology and Biotechnology 26 : 347-351.

Margaritis, A., and Pace, P.W. 1985. Microbial polysaccharide. In Moo Young, M. (ed.). Comprehensive Biotechnology vol. 3. pp. 1005–1043. New York : Pergamon Press.

Martin, O., Schwach, E., Averous, L., and Couturier, Y. 2001. Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Plasticized Wheat Starch. Starch/Starke 53 : 372-380.

Mata, J.A., et al. 2008. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. Journal of Applied Microbiology 105 : 521–528.

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

Mcneil, B., and Harvey, M.L. 1993. Viscous fermentation products. CRC in biotechnology 13 : 275-304.

Mengistu, Y., Edwards, C., and Saunder, J.R. 1994. Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumoniae* K1. Journal of Applied Bacteriology 76 : 424.

Mironescu, M. 2003. Microbial polysaccharides. Production, characterization and properties. Food Technology 2 : 26-38.

Mogensen, G., et al. 2002. Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. International Diabetes Federation 377 : 4-10.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot R., and Remaud-Simeon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11 : 675-685.

Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J., and Guerrero, M.G. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. Journal of Biotechnology 60 : 175-182.

Moscovici, M., et al. 2009. Curdlan-type polysaccharide obtained using a strain of *Agrobacterium rhizogenes*. Romanian Biotechnological Letters 14 : 4530-4537.

Mozzi, F., et al. 2006. Diversity of heteropolysacharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. Applied and Environmental Microbiology 72 : 4431-4435.

Nieto, M.B., and Andon, G. 2009. Gum arabic replacements in: (1) panning, confections, adhesion & coatings; (2) edible films and flavor encapsulation; and (3) lithography U.S. Patent 20100028521.

Nishinari, K., Zhang, H., and Ikeda, S. 2000. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. Current Opinion in Colloid and Interface Science 5 : 195-201.

Nitta, Y., and Nishinari, K. 2005. Gelation and gel properties of polysaccharides gellan gum and tamarind xyloglucan. International Journal of Biological Macromolecules 5: 47-52.

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

Ogunbanwo, S.T., and Okanlawon, B.M. 2009. Influence of Nutrients Utilization and Cultivation Conditions on the Production of Lactic acid by Homolactic fermenters. Biotechnology 8 : 107-113.

Oshima, R., and Kumanotani, J. 1984. Structural studies of plant gum from sap of the Lac tree, *Rhus vernicifera*. Carbohydrate Research 127 : 43–57.

Othmer, K. 2007. Food and feed technology New York : John Wiley and Sons Inc.

Panda, H. 2010. The Complete Book on Gums and Stabilizers for Food Industry Delhi : Asia Pacific Business Press Inc.

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

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

Pedersen, J.K. 1980. Carrageenan, pectin and xanthan/locust bean gum gels. Trends in their food use. Food Chemistry 6 : 77-88.

Peik, J.A., Steenbergen, S.M., and Hayden, H.R. 1983. Heteropolysaccharide S-194 U.S. Patent 4,401,760.

Perriere, G., and Gouy, M. 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie 78 : 364-369.

Pieper, J.A., and Rutledge, D.R. High Performance (Pressure) Liquid Chromatography (HPLC) [online]. 1989. Available from : http://www.boomer.org/c/p3/c03/c0305.html [2011, February 1]

Pidoux, M., Brillouet, J.M., and Quemener, B. 1988. Characterization of the Polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from Sugary Kefir Grains. Biotechnology Letters 10 : 415-420.

Pidoux, M., de Ruiter, G.A., Brooker, B.E., Colquhoun, I.T., and Morris, V.J. 1990. Microscopic and chemical studies of a gelling polysaccharide from *Lactobacillus hilgardi*. Carbohydrate Polymers 13 : 351.

Prabhat, K., and Sushant, K. 2009. Dextran polysaccharides: successful macromolecular carrier. International Journal of Pharmaceutical sciences 1 : 353-368.

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

Purama, R.K., Goswami, P., Khan, A.T., and Goyal, A. 2009. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. Carbohydrate Polymers 76 : 30-35.

Racine, M., Dumont, J., Champagne, C.P., and Morin, A. 1991. Production and characterization of the polysaccharide from *Propionibacterium acidipropionici* on whey based media. Journal of Applied Bacteriology 71 : 233.

Rau, V., Muller, R.J., Cordes, K., and Klein, J. 1989. Process and molecular data of branched 1,3 β-D-glucans in comparison with xanthan. Bioprocess Engineering 5 : 89.

Reed, K.J., Levchak, M.J., and Schaefer, J.W. 1994. Thermogravimetric apparatus U.S. Patent 5,321,719.

Ricciardi, A., and Clementi, F. 2000. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. Italian Journal of Food Science 1 : 23–45.

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

Robyt, J.F. 1986. Encyclopedia of Polymer Science and Technology 4th ed. New York : John Wiley and Sons Inc.

Roller, S., and Dea, I.C.M. 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for food. Critical Reviews in Biotechnology 12 : 261.

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.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal 12 : 163–171.

Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F., and de los Reyes-Gavilan, C.G. 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: Mayo, B., Lopez, P., Perez-Martinez, G. (eds.) Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications pp. 137-166. Kerala : Research Signpost.

Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., and de los Reyes-Gavilan, C.G. 2009. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications. Microbial Glycobiology 45 : 887-902.

Salehizadeh, H., Vossoughi, M., and Alemzadeh, I. 2000. Some investigations on bioflocculant producing bacteria. Biochemical Engineering Journal 5 : 39-44.

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

Salminen, S., and Wright, A.V. 1993. Lactic acid bacteria 1st ed. New York : Marcel Dekker Inc.

Sanchez, A., Ramirez, M.E., Torres, L.G., Galindo, E., and Mob, W.J. 1997. Characterisation of xathan from selected *Xanthomonas* strains cultivated under

constant dissolved oxygen. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13 : 443-451.

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

Sandford, P.A., Cottrell, I.W., and Pettitt, D.J. 1984. Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications. Pure and Applied Chemistry 56 : 879-892.

Schellhaass, S.M. 1983. Characterization of exocellular slim produced by bacterial starter cultures used in the manufacture of fermented dairy products Ph.D. thesis. University of Minnesota. Dissertation Abstracts International. B44. 2698.

Shah, A.A., Hasan, F., Ahmed, S., and Hameed, A. 2003. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial and outpatients (ambulatory). Pakistan Journal of Medical Sciences 19 : 187-191.

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

Shin, J.H., Kim, D.I., Kim, H.R., Kim, D.S., Kook, J.K., and Lee, J.N. 2007. Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on echocardiography. Journal of Infection 54 : 149-151.

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

Shu, C.H., and Yang, S.T. 1991. Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. Biotechnology and Bioengineering 37 : 567–574.

Sidebotham, R.L. 1974. Dextrans. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 30 : 371-444.

Sikkema, J., and Oba, T. 1998. Extracellular polysaccharides of lactic acidbacteria. Snow Brand R&D Reports 107 : 1-31.

Slodki, M.E. 1978. Microbial polysaccharides. In Othmer, K. (ed.). Encyclopedia of Chemical Technology p. 439. New York : John Wiley and Sons Inc.

Smith, G.S. 1971. Plant Cell Wall Structure and Cell Wall Growth. Journal of the Biological Society 19 : 43-49.

Smitinont, T., et al. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. International Journal of Food Microbiology 51 : 105-111.

Soares, R.M.D., Lima, A.M.F., Oliveira, R.V.B., Pires, A.T.N., and Soldi, V. 2005. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. Polymer Degradation and Stability 90 : 449-454.

Stephen, A.M., Phillips, G.O., and Williams, P.A. 2006. Food Polysaccharides and Their Applications 2nd ed. CRC Press.

Sutherland, I.W. 1983. Extracellular polysaccharides. In Dellweg, H. (ed.). Biotechnology p. 531. Weinheim : Verlag Chemic.

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

Sutherland, I.W. 1994. Structure function relationship in microbial exopolysaccharide. Biotechnology Advances 12 : 393-448.

Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of bacterial polysaccharides. Trends in Biotechnology 16 : 41-46.

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.

Toeda, K., and Kurane, R. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. Agricultural and Biological Chemistry 55 : 2793-2799.

Tombs, M., and Harding, S.E. 1998. An introduction to polysaccharide biotechnology London : Taylor and Francis.

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

Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S., and Lavermicocca, P. 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. Systematic and Applied Microbiology 32 : 438-448.

Van Beek, S. 1997. Caracterisation des activites metaboliques des ferments utilises en industrie des viandes. Evaluation de la production de polysaccharides exocellulaires par des souches de pediocoques et de lactobacilles In Memoire de fin d'etudes. Institut Superieur Agricole de Beauvais. France. Centre de recherche et de developpement sur les aliments. P. 70. Canada : St. Hyacinthe.

Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., and De Wulf, P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. Polymer Degradation and Stability 59 : 93-99.

van den Berg, D.J.C., et al. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Applied and Environmental Microbiology 61 : 2840-2844.

Vanderzant, C., and Nickelson, R. 1969. A microbiological examination of muscle tissue of beef, pork and lamb carcasses. Journal of Milk and Food Technology 32 : 257-261.

van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., ten Brink, B., Smith, M.R., and Dijkhuizen, L. 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 50 : 697-703.

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T., and De Vuyst, L. 2004. Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk based medium. Journal of Applied Microbiology 97 : 1257-1273.

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

Vijayendra, S.V.N., and Sharath Babu R.S. 2008. Optimization of a new heteropolysaccharide productionby a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181. Letters in Applied Microbiology 46 : 643-648.

Vincent, J.L., et al. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. JAMA 274 : 639-644.

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

Wecker, A., and Onken, V. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production by *Aureobasidium pullulans*. Biotechnology Letters 13 : 155.

Welman, A.D., and Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology 21 : 269-274.

Whistler, R.L., and BeMiller, J.N. 1973. Industrial Gums New York : Academic Press Inc.

Whistler, R.L., and BeMiller, J.N. 1993. Industrial gums: polysaccharides and their derivatives 3rd ed. New York : Academic Press Inc.

Whistler, R., and Daniel, J.R. 1990. Functions of polysaccharides in foods. In Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S. (eds.). Food Additives pp. 395-423. New York : Marcel Dekker Inc.

Whitfield, C. 1998. Bacterial extracellular polysaccharides. Canadian Journal of Microbiology 34 : 415.

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

Williams, R., and Mittal, G.S. 1999. Water and Fat Transfer Properties of Polysaccharide Films on Fried Pastry Mix. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology 32 : 440-445.

Wongsuphachat, W., H-Kittikun, A., and Maneerat, S. 2010. Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confuse* NH 02 isolated from Thai

fermented sausages. Songklanakarin Journal of Science and Technology 32 : 27-35.

Xu, R., Ma, S., Wang, Y., Liu, L., and Li, P. 2010. Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. African Journal of Microbiology Research 4 : 783-795.

Yalpani, M., and Sandford, P.A. 1987. Commercial polysaccharides: recent trends and developments. In Yalpani, M. (ed.). Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure/property relations and applications pp. 311-335. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

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

Zallie, J.P. 1988. New starches for gelling and non-gelling applications. Manufacturing Confectioner 68 : 99-104.

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

Zhang, J., Wang, R., Jiang, P., and Liu, Z. 2002. Production of an exopolysaccharide bioflocculant by *Sorangium cellulosum*. Letters in Applied Microbiology 34 : 178-181.

Zhang, Z.Q., Lin, B., Xia, S.Q., Wang, X.J., and Yang, A.M. 2007. Production and application of a bioflocculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. Journal of environmental sciences (China) 19 : 660-666.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

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

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

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

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

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส** (Lactobacilli MRS Agar) **ผสม bromocresol purple ตามวิธีของ** Ogunbanwo **และ** Okanlawon (2009)

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone no.3)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	20.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (di -Ammonium hydrogen citrate)	2.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตรต (Sodium acetate)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.05	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โบรโมครีซอล เพอร์เพิล (bromocresol purple)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจากอาหารสูตรแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร**

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone no.3)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (di -Ammonium hydrogen citrate)	2.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตรต (Sodium acetate)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.05	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม

ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	6.5	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

5. อาหารแข็ง MacConkey

เปปโตน (Peptone)	17.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตน (Proteose peptone)	3.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	10.0	กรัม
Bile salt	1.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	13.5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)	0.001	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.4	

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

6. Motility test media อาหารสำหรับทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

ทริปโตส (Tryptose)	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	5.0	กรัม
0.5%ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์	100	มิลลิลิตร
(0.5%Triphenyl tetra zolium chloride)		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

นำทริปโตสและวุ้นผสมกันแล้วต้มให้เดือดรอจนสารละลาย แล้วเติม 0.5%ไตรฟีนิล-เตตระโซเลียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นทำเป็น agar tall

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

7. **อาหาร** Triple sugar iron agar (TSI slant)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	20.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	10.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	10.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	1.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.2	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.3	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	12.0	กรัม
ฟีนอลเรด (Phenol red)	0.024	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.4	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

8. **อาหารเหลวทริปโตน หรือทริปโตเฟน** (Tryptone broth or Tryptophane broth) **สำหรับ ทดสอบหาผลิตภัณฑ์** Indole

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.2	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

9. อาหารเหลวไนเตรท (Nitrate broth)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.4	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

10. อาหารเหลวเอสคูลิน (Esculin broth)

เอสคูลิน (Esculin)	1.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	0.25	กรัม
เฟอริก ซิเตรท (Ferric citrate)	0.25	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	0.50	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.50	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.01	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	0.10	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

11. อาหารเหลวอาร์จีนีน (Arginine broth)

เปปโตน (Peptone)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.03	กรัม
แอลอาร์จีนีนไฮโดรคลอไรด์ (L(+) arginine HCl)	1.0	กรัม
ฟีนอล (Phenol)	0.001	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

12. Carbohydrate fermentation broth **อาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล**

เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน	10.0	กรัม
(Pancreatic Digest of Casein)		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	g
ฟีนอลเรด (Phenol red)	0.018	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	7.4	

เติมคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด 1% ลงในอาหารฟีนอลเรดอย่างละ 1 หลอด

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

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

2. 10 M NaOH

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

3. สารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์

ฟีนอล	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. สารละลาย Coomassie blue

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

5. 1 % tetramethel-*p*-phenylenediamine dihydrochloride

tetramethel-*p*-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำเกลือปราศจากเชื้อ	100	มิลลิลิตร

6. 3% **สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์** (Hydrogen peroxide solution)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30%	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	9.0	มิลลิลิตร

7. **สารละลายโคแวค** (Kovac's solution)

p-dimetylaminobenzaldehyde	10.0	กรัม
เอมิล หรือ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (amyl or isoamyl alcohol)	150	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)	50	มิลลิลิตร

ละลายแอลดีไฮด์ด้วยแอลกอฮอล์ แล้วเติมกรดลงไปอย่างช้าๆ ภายหลังใช้แล้วให้เก็บไว้ที่พ้นแสงและในตู้เย็น (เตรียมใหม่ก่อนใช้ ไม่ควรเก็บนานเกิน 2-3 วัน)

8. **สารละลายไนเตรท** (Nitrate solution) **สำหรับการทดสอบไนเตรทรีดักชั่น**

สารละลายแอลฟา-แนฟทิลเอมีน (α-Naphthylamine) ประกอบด้วย

แอลฟา-แนฟทิลเอมีน (α-Naphthylamine)	0.5	กรัม
30% อะซิติก แอซิด (Acetic acid)	100	มิลลิลิตร

สารละลายกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid solution) ประกอบด้วย

กรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid)	0.8	กรัม
30% อะซิติก แอซิด (Acetic acid)	100	มิลลิลิตร

9. **สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล**

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.004	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

10. **สารละลาย** Cetylpyridinium Chloride (CPC) **ความเข้มข้น** 10 **เปอร์เซนต์**

Cetylpyridinium Chloride (CPC)	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

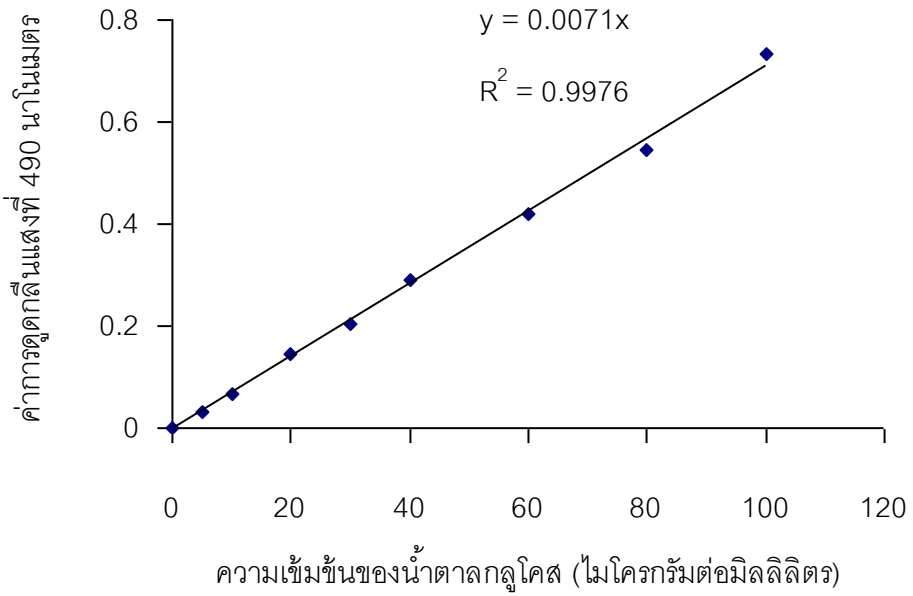
11. **เอทานอล** 70%

เอทานอล 99%	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

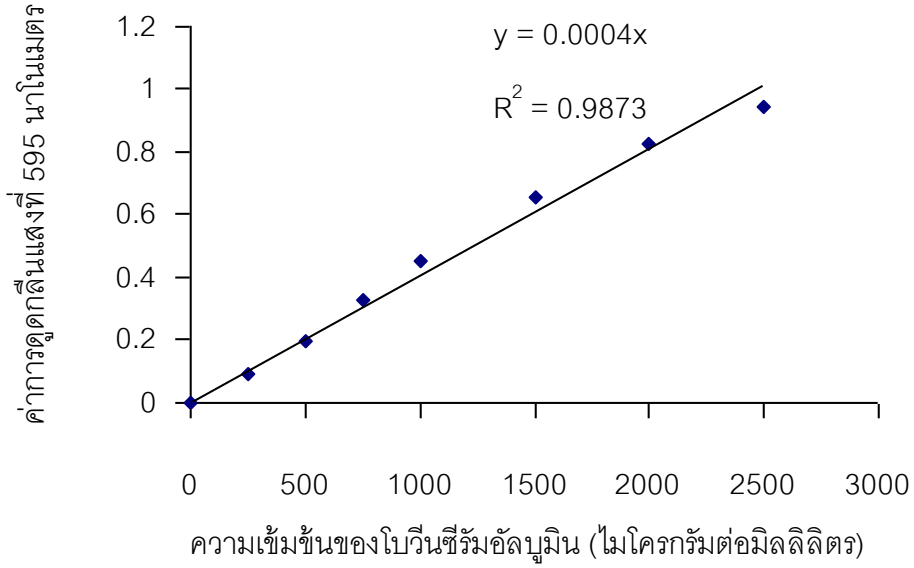
กราฟมาตรฐาน

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



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. **ลำดับนิวคลีโอไทด์** 16S rDNA **ของ** *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusus*) **สายพันธุ์** LAB1

AATTATCTCATCATTCGCTGAAGGGTCTCGATAGGGACGCTCTTTTGATT
TTGTGTGTACAAAGTGTTATGGTTGTCGGGGCGGGTTGTTAGAGGAGTTG
GGGGAAATTATTTCCCGCGGAAGATGAAATGGGGATCCTTTTATAGTATG
TTTTTTATNGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTC
GAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGAT
GGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACC
TCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAAT
GACAACCGCATGGTTGTTATTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGA
TGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCG
ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGAC
ACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGG
CGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCG
TAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGT
GTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
GCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGG
AATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTA
GGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCC
CTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTG
CCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGC
TAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA
CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGTTCTTTGTACACACCGGCCCGTCAAACCATGGAAGAGTTT
GTAACACCCAAAGCCCGGTGGGGGTAACCTTTCGGGAGCCAGCCGTCTAA
GTGGGAATGATTGTG

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรรษมน นิลสันเทียะ เกิดวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดสิงห์บุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ที่อยู่ปัจจุบัน 287 หมู่ 13 ต.ท่าโรง อ.วิเชียรบุรี จ.เพชรบูรณ์ 67130

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “ TSB 2009 : Biotechnology : A Solution to the Global Economic Crisis? ” ระหว่างวันที่ 24-25 กันยายน 2552 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิตต์ ในหัวข้อเรื่อง “ Isolation and Characterization of Exopolysaccharide from Bacteria ”