สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างผลไม้ เช่น อ้อยที่สวนผลไม้ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และอุทยานแห่งชาติกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากทั้งสองแหล่ง นำมาคัดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.3.1.1แล้วเลือกเก็บโคโลนีโดยสังเกตลักษณะที่มีเมือกเยิ้ม และมีความหนืด ดังแสดงในรูปที่ 4.1 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้จำนวน 49 สายพันธุ์ เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 49 สายพันธุ์ มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดตามวิธีในข้อ 3.3.1.2 และวิเคราะห์ส่วนประกอบน้ำตาลของพอลิแซ็กคาไรด์เทียบกับสารมาตรฐานมอโนแซ็กคาไรด์โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 24 สายพันธุ์ ที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

(ก)

(ข)

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีเมือกเยิ้ม และมีความหนืด คัดแยกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก) 24 ชั่วโมง และ ข) บางสายพันธุ์เลี้ยงจนโคโลนีโตสุด

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ (สายพันธุ์)	จำนวนแบคทีเรียที่ให้ผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่บนแผ่น TLC (สายพันธุ์)
อ้อย	อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	4	28	15
	อุทยานแห่งชาติกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	5	21	9
รวม	2	9	49	24

ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการวิเคราะห์โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ของแบคทีเรีย 24 สายพันธุ์

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์
1	EN01	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
2	EN02	ไซโลส
3	EN03	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
4	EN05	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
5	EN06	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
6	EN07	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
7	EN09	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
8	EN10	แรมโนส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
9	EN11	ไซโลส
10	EN13	ไซโลส
11	EN14	ไซโลส
12	EN15	แรมโนส และ ไซโลส หรือ ไรโบส
13	EN16	แรมโนส และ ไซโลส หรือ ไรโบส
14	EN20	แรมโนส และ ไซโลส หรือ ไรโบส

ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการวิเคราะห์โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ของแบคทีเรีย 24 สายพันธุ์ (ต่อ)

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์
15	EN21	แรมโนส และ ไซโลส หรือ ไรโบส
16	EP01	แรมโนส
17	EP02	แรมโนส
18	EP04	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
19	EP07	แรมโนส
20	EP08	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
21	EP10	แรมโนส
22	EP11	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
23	EP14	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
24	EP20	แรมโนส

จากตารางที่ 4.2 แบคทีเรียทั้ง 24 สายพันธุ์ มีผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่ตรงกับสารมาตรฐาน โดยพบมอโนแซ็กคาไรด์พวกแรมโนส ไซโลส ไรโบส และกาแลคทิวโรนิก แอซิด เป็นส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็นเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) 9 สายพันธุ์ และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharides) 15 สายพันธุ์

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงระดับขวดเขย่า

นำแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม และมีความหนืด ที่ได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นทั้ง 24 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อในข้อ 3.3.3และทดสอบความสามารถการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในข้อ 3.3.4.1.1และ 3.3.4.1.2 ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในอาหารเหลวจะให้ส่วนน้ำใสที่มีลักษณะข้นหนืด ดังรูปที่ 4.2 และเมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรีย

ทั้ง 24 สายพันธุ์ มีแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง โดยมีค่าอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์หลังการแยกและอบแห้งต่อน้ำหนักเซลล์สูง ตามวิธีในข้อ 3.3.4 ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงที่สุด โดยมีค่าอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 1.68 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบลักษณะอาหารก่อนเลี้ยงเชื้อและหลังการเลี้ยงเชื้อ (ลักษณะข้นหนืด)

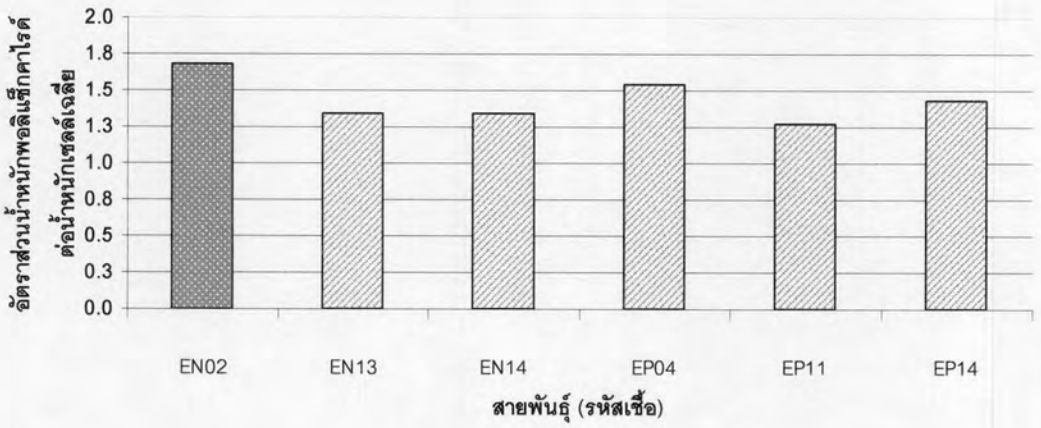
ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์เฉลี่ย และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 24 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์ (รหัสเชื้อ)	น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เฉลี่ย
EN01	3.09	3.14	1.02
EN02	4.21	7.08	1.68
EN03	2.85	2.73	0.96
EN05	2.76	2.65	0.96

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์เฉลี่ย และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 24 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ (ต่อ)

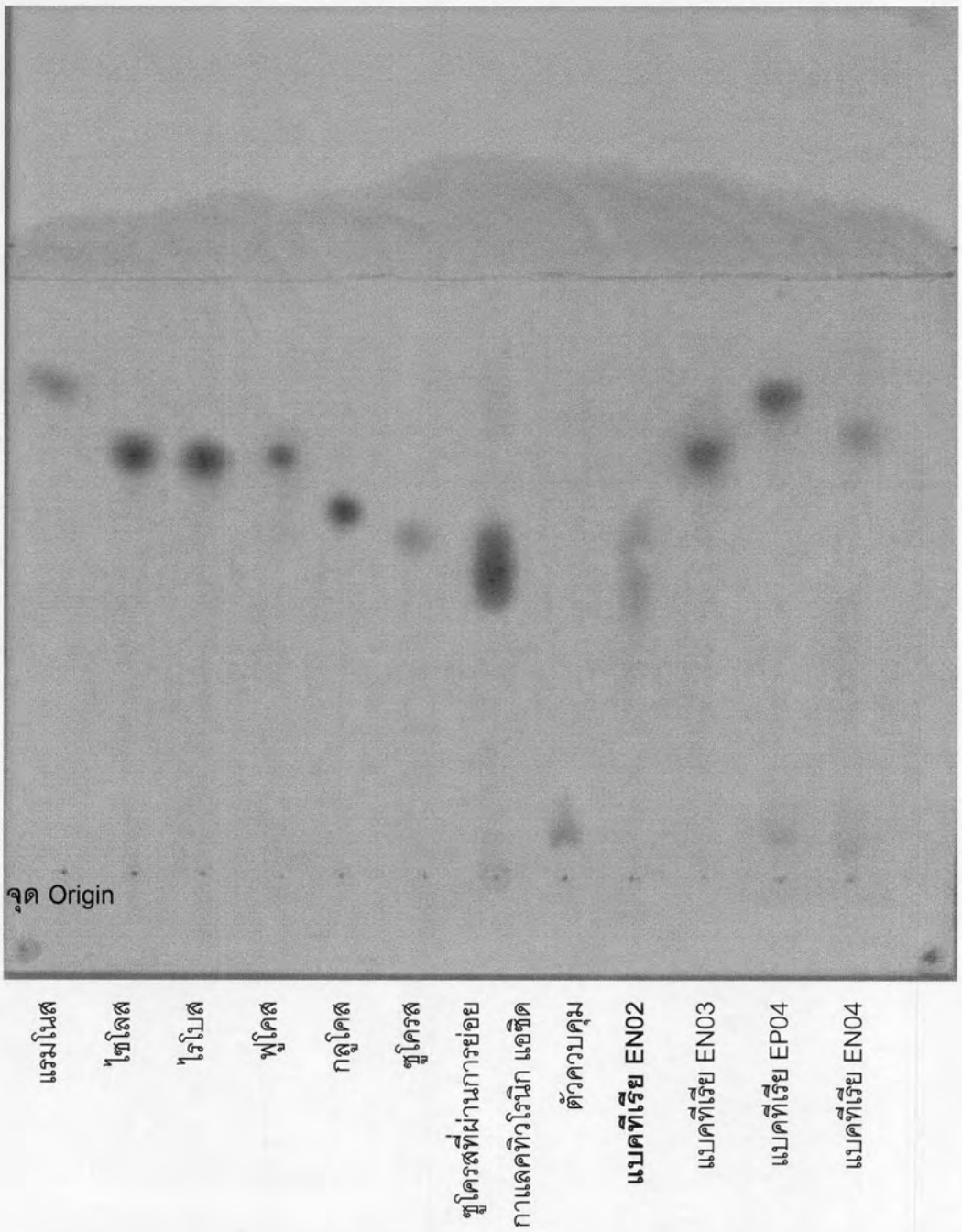
สายพันธุ์ (รหัสเชื้อ)	น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เฉลี่ย
EN06	2.91	2.55	0.88
EN07	2.57	2.77	1.08
EN09	3.38	3.17	0.94
EN10	3.28	2.95	0.90
EN11	3.09	3.65	1.18
EN13	3.87	5.18	1.34
EN14	4.09	5.48	1.34
EN15	3.72	3.54	0.95
EN16	4.09	3.61	0.88
EN20	3.24	3.60	1.11
EN21	3.69	3.24	0.88
EP01	2.91	3.23	1.11
EP02	2.85	2.95	1.03
EP04	3.13	4.82	1.54
EP07	4.00	3.37	0.84
EP08	3.30	3.65	1.10
EP10	3.27	3.26	1.00
EP11	3.53	4.48	1.27
EP14	3.91	5.61	1.44
EP20	3.31	3.58	1.08

หมายเหตุ สีแดงหมายถึง แบคทีเรียผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง

เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ มายืนยันส่วนประกอบโดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด และวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์เบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของแต่ละสายพันธุ์กับค่า R_f ของสารมาตรฐาน แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 EN13 และ EN14 มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ EP04 EP11 และ EP14 มีน้ำตาลไรโบส และกาแลคทิวโรนิกแอซิด เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4



*control อาหารเลี้ยงเชื้อทิมิซูโครสเป็นส่วนประกอบ

รูปที่ 4.4 แถบการเคลื่อนที่บน TLC (แผ่นซิลิกาเจล 60, บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม.) ของสารมาตรฐาน ตัวควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบ) และพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือก ใช้ Butanol : Pyridine : 0.1 M HCl เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase)

ตารางที่ 4.4 ค่า R_f (Retardation factor) ของสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ผลิตได้ และองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการวิเคราะห์โดย Thin Layer Chromatography (TLC)

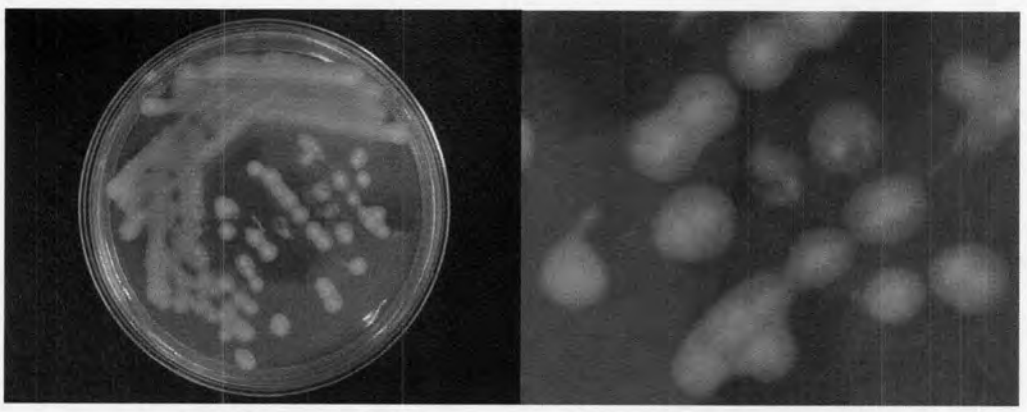
ตัวอย่าง	ค่า R_f	องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์
แรมโนส	0.8089	-
ไซโลส	0.7091	-
ไรโบส	0.6953	-
ฟูโคส	0.6598	-
กลูโคส	0.6062	-
ซูโครส	0.5689	-
ซูโครสที่ผ่านการย่อย	0.4264	-
กาแลคทิวโรนิก แอซิด	0.0818	-
ตัวควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ)	0.4656	-
EN02	0.7091	ไซโลส
EN13	0.7061	ไซโลส
EN14	0.7085	ไซโลส
EP04	0.6746 และ 0.1399	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
EP11	0.6849 และ 0.1474	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด
EP14	0.6849 และ 0.1456	ไรโบส และ กาแลคทิวโรนิก แอซิด

จากตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ให้น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ 7.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเพียงตัวเดียวเป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ (ดังแสดงในรูปที่ 4.4) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ไปศึกษาทางอนุกรมวิธาน สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

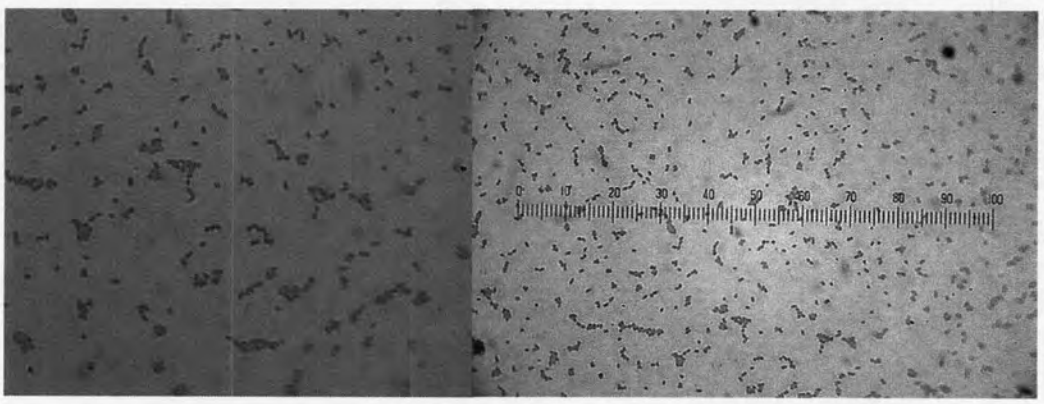
4.3 การศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02

4.3.1 ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 พบว่าลักษณะของโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีลักษณะกลมรี สีขาวครีม โคโลนีนูน มันวาว ขอบเรียบ และทึบแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และเมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ย้อมติดสีแกรมลบ เซลล์ของแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาดกว้าง 0.8-1.0 ไมครอน และ ยาว 1.0-2.0 ไมครอน ไม่มีการสร้างสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



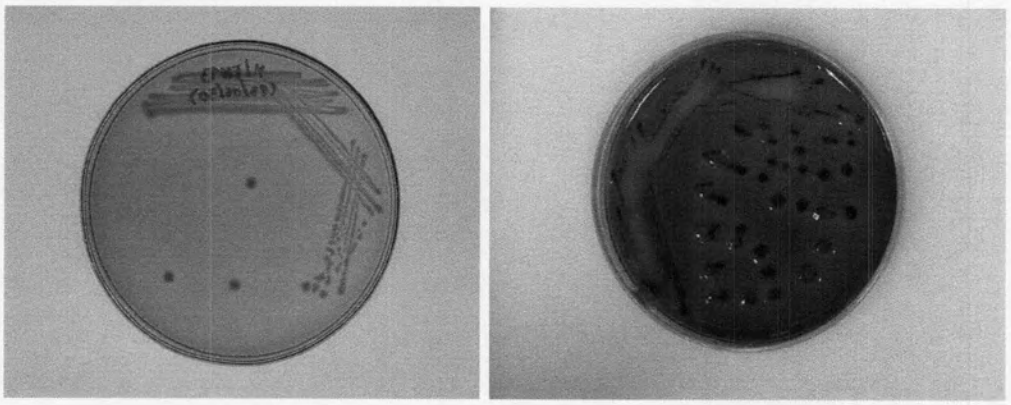
รูปที่ 4.6 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100×10)

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบโคโลนีจำนวนมาก ซึ่งมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิ 20 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบโคโลนีบนอาหารแข็งเลย ซึ่งไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมินี้ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ครั้งแรกที่ตรวจพบเชื้อว่าแบคทีเรียมีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมลบ เพื่อตรวจสอบว่าจัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ชนิดใดจึงทดสอบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 สามารถย่อยน้ำตาลแลคโทสในอาหารได้ จึงมีโคโลนีมีสีชมพูอ่อน แต่ไม่เป็นเมือกเยิ้ม และเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) พบว่าลักษณะโคโลนีใหญ่ สีม่วงอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ซึ่งมีลักษณะตรงกับ *Enterobacter* sp. (Howard, 1994)

ตารางที่ 4.5 ผลการจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

การศึกษา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา
ลักษณะโคโลนี	สีขาวครีม โคโลนีนูน มันวาว ขอบเรียบ ทึบแสง
การย้อมติดสีแกรม	แกรมลบ
รูปร่างและขนาดของเซลล์	ลักษณะแท่งสั้น กว้าง 0.8-1.0 ไมครอน ยาว 1.0-2.0 ไมครอน
การสร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์
การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ	
20 องศาเซลเซียส	-
25 องศาเซลเซียส	+
30 องศาเซลเซียส	+++
37 องศาเซลเซียส	+++
40 องศาเซลเซียส	++
45 องศาเซลเซียส	-
การเจริญบนอาหารแข็ง	
MacConkey	โคโลนีสีชมพูอ่อน
Eosin methylene blue (EMB)	โคโลนีใหญ่ สีม่วงอ่อน



(ก) (ข)

รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ขึ้นบนอาหาร
ก) MacConkey Agar ข) Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

4.3.2 ผลทางชีวเคมี

จากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) โดยพิจารณาจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และความสามารถในการหมักน้ำตาล สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ควรจะจัดเป็น *Enterobacter cloacae* ดังผลเปรียบเทียบที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบลักษณะทางทั่วไปและทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 กับเชื้อเทียบเคียง

การทดสอบ	แบคทีเรีย สายพันธุ์ EN02	*Enterobacter cloacae*	*Enterobacter cancerogenus*
O2 requirement	Facultative anaerobe	Facultative anaerobe	Facultative anaerobe
Motility	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	+
Indole production	-	-	-
Methyl red	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+
Citrate (Simmons)	+	+	+
TSI reaction	A/A	A/A	A/A
H_2S production (TSI)	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+
Urea hydrolysis	-	d	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
KCN growth	+	+	+
Oxidation-fermentation	(O-F) F	(O-F) F	(O-F) F
Beta-D-galactosidase	+	+	+
Litmus milk	Acid, clot	Acid, clot	Acid, clot

<u>หมายเหตุ</u> (d) 11-89% ให้ผล Positive
(O-F) F เกิดการหมัก
A/A สร้างกรดและก๊าซ
Acid, clot มีฟองก๊าซและเกิด clot

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบลักษณะทางทั่วไปและทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 กับเชื้อเทียบเคียง (ต่อ)

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต	แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02	*Enterobacter cloacae*	*Enterobacter cancerogenus*
ดี-กลูโคส	+	+	+
กาแลคโทส	+	+	+
ฟรุคโทส	+	+	+
ไรโบส	+	+	+
แอล-อะราบิโนส	+	+	+
ดี-แมนโนส	+	+	+
ดี-ไซโลส	+	+	+
แอล-แรมโนส	+	+	+
ดี-แมนนิทอล	+	+	+
กลีเซอรอล	+	+	+
ดิวซิทอล	-	-	-
ดี-ซอร์บิทอล	+	+	-
myo-Inositol	-	-	-
มอลโทส	+	+	+
ซูโครส	+	+	-
แลคโทส	+	+	-
เมลิไบโอส	+	+	-
ทรีฮาโลส	+	+	+
ราฟฟิโนส	+	+	-
อินูลิน	-	-	-

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (Positive)

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (Negative)

4.3.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 (ภาคผนวก ง) ความยาว 1,456 bp เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ16SrDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter cloacae* (Muniyandi และคณะ, 2006) 98.97% และ สกุล *Enterobacter cancerogenus* 98.73% (Hauben และคณะ, 1998) ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกับแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02

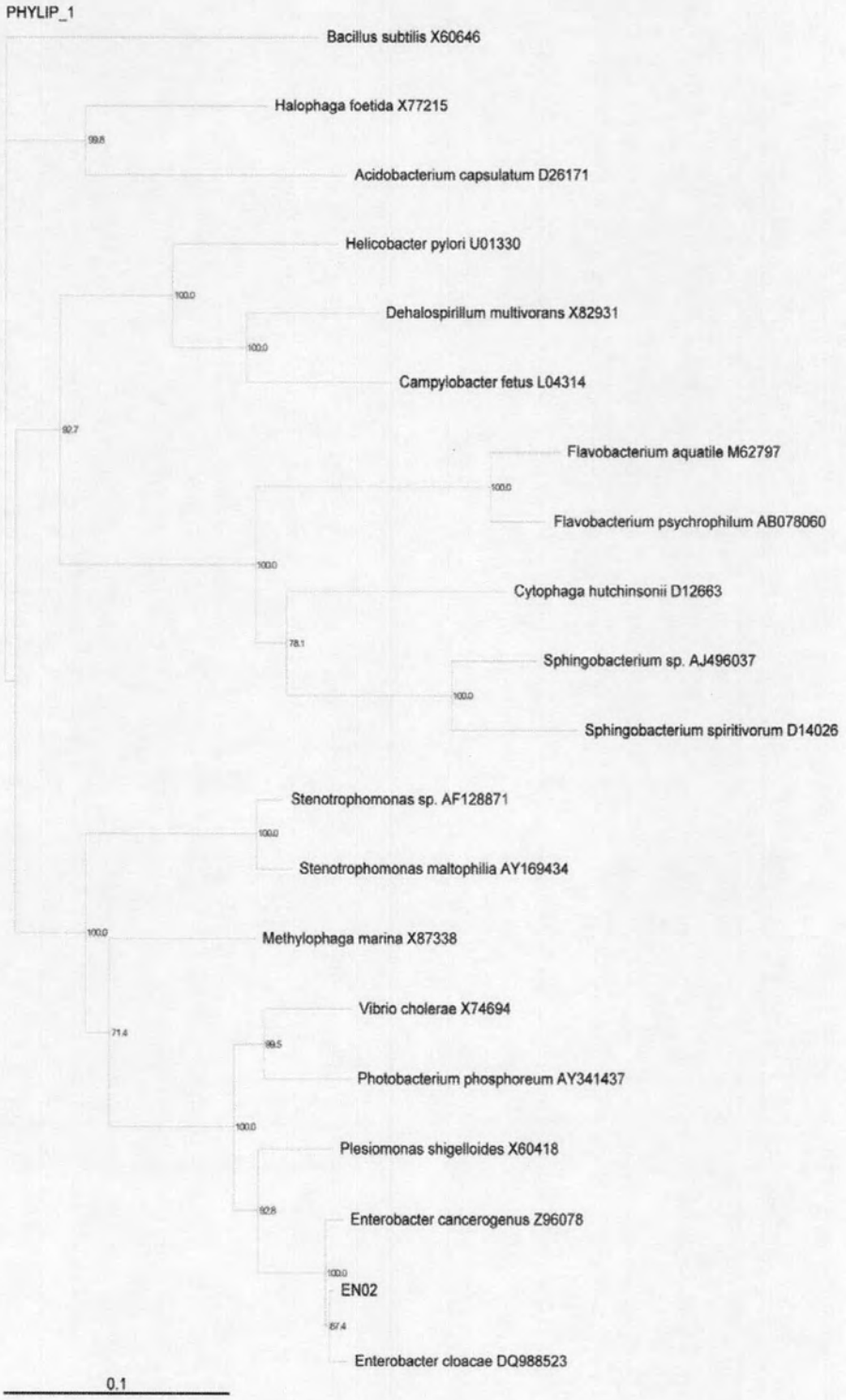
ลำดับ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession No.	Sequence identity (%)
1	*Enterobacter cloacae*	DQ988523	98.97%
2	*Enterobacter cancerogenus*	Z96078	98.73%

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 และแบคทีเรียในกลุ่มแกรมมาโพรติโอแบคทีเรีย (Gamma-Proteobacteria) ดังแสดงในตารางที่ 4.8 มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal W และนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนวมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package ดังแสดงในรูปที่ 4.8

เมื่อวิเคราะห์ผลร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล *Enterobacter cloacae*

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

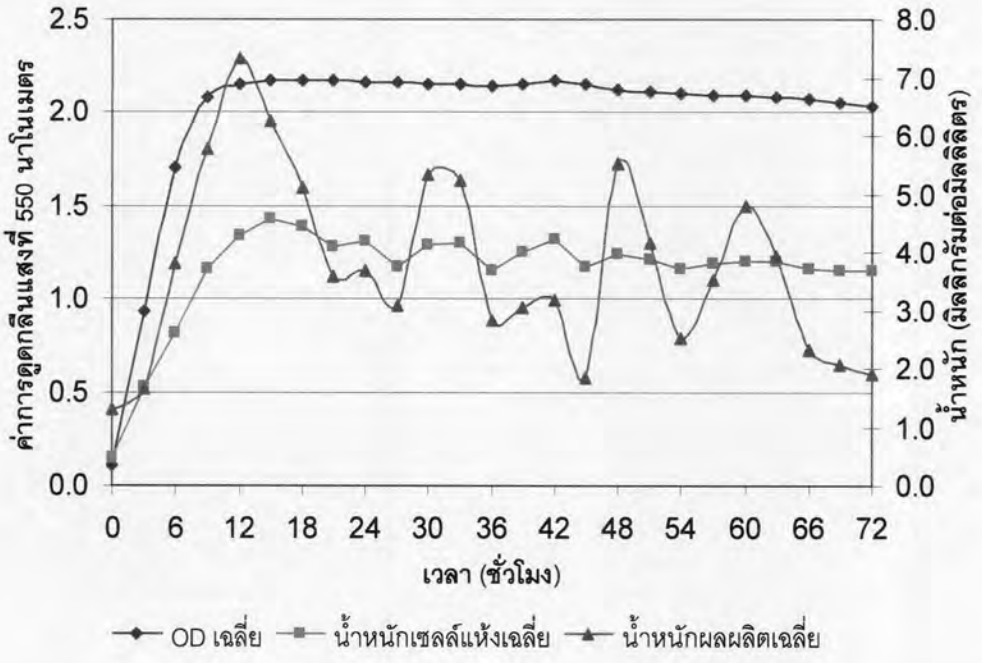
จุลินทรีย์	Accession	Sequence identity (%)	อ้างอิง
Sulfurospirillum multivorans (Dehalospirillum multivorans)	X82931	82.17	Scholz-Muramatsu และคณะ (1995)
Campylobacter fetus	L04314	81.68	Wesley และคณะ (1995)
Helicobacter pylori	U01330	81.76	Eckloff และคณะ (1994)
Stenotrophomonas sp. B50	AF128871	86.41	Mocali และคณะ (2003)
Stenotrophomonas maltophilia	AY169434	85.88	Sheridan และคณะ(2003)
Enterobacter cloacae subsp. dissolvens	DQ988523	98.97	Muniyandi และคณะ (2006)
Enterobacter cancerogenus	Z96078	98.73	Hauben และคณะ (1998)
Plesiomonas shigelloides	X60418	94.88	Martinez-Murcia และคณะ (1992)
Vibrio cholerae	X74694	92.13	Ruimy และคณะ (1994)
Photobacterium phosphoreum	AY341437	92.86	Ast และ Dunlap (2004)
Methylophaga marina	X87338	87.74	Janvier และ Grimont (1995)
Holophaga foetida	X77215	84.58	Liesack และคณะ (1994)
Acidobacterium capsulatum	D26171	80.43	Hiraishi และคณะ (1995)
Bacillus subtilis	X60646	80.56	Ash และคณะ (1991)
Sphingobacterium sp. p11E	AJ496037	78.14	Wery และคณะ (2003)
Sphingobacterium spiritivorum	D14026	75.27	Nakagawa และ Yamasato (1996)
Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406	D12663	77.22	Nakagawa และ Yamasato (1993)
Flavobacterium aquatile	M62797	78.25	Woese และคณะ (1990)
Flavobacterium psychrophilum	AB078060	79.12	Nakagawa และคณะ (2002)



รูปที่ 4.8 phylogenetic tree บริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ 16SrDNA ของ *Bacillus subtilis* เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาคือความเชื่อมั่นของกิ่ง ด้วย bootstrap

4.4 รูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร

จากการศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อ และศึกษารูปแบบการเจริญในข้อ 3.3.3 และ 3.3.6 ตามลำดับ จากนั้นติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามวิธีในข้อ 3.3.9 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 การเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

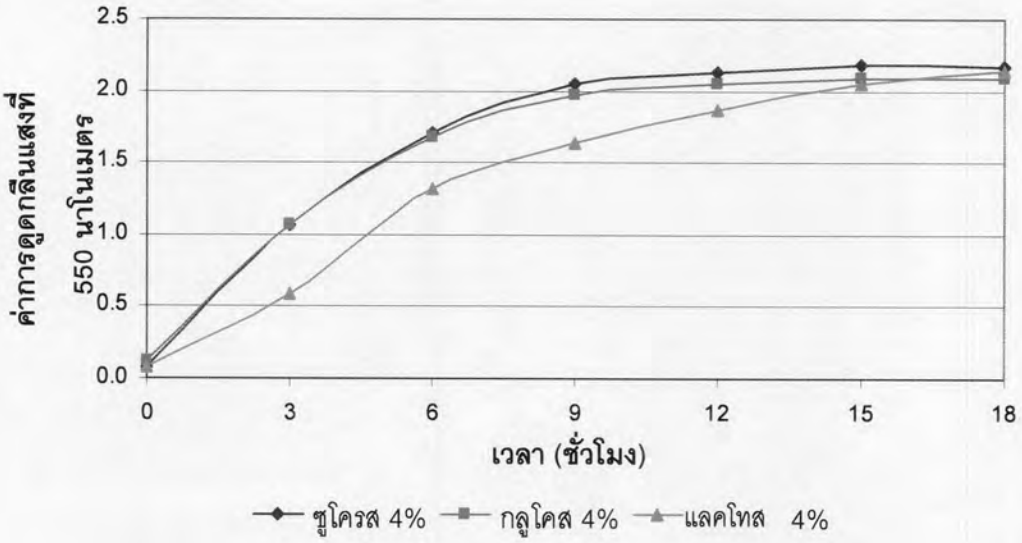
จากกราฟรูปที่ 4.9 พบว่า ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงเรื่อยๆ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เมื่อแบคทีเรียขาดแคลนอาหารแล้วนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นกลับมาใช้ใหม่ ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไปจึงเก็บตัวอย่างตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า พอลิ

แซ็กคาไรด์เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญ นั่นถือเป็นเป็นสารเมแทบอไลต์แบบปฐมภูมิ (Primary metabolite)

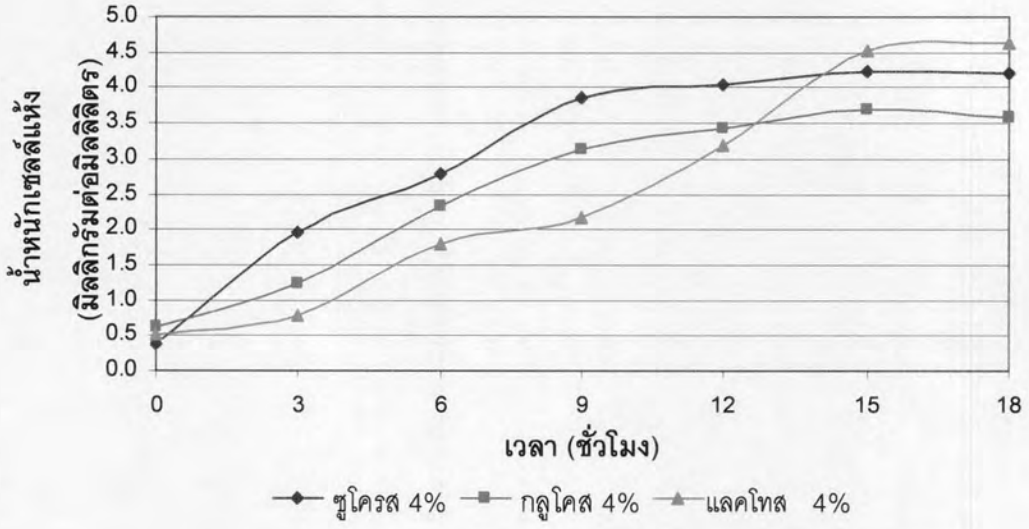
4.5 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.5.1 การผันแปรแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 และรูปที่ 4.11 พบว่าการใช้ซูโครส และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่าการใช้แลคโทส และเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป

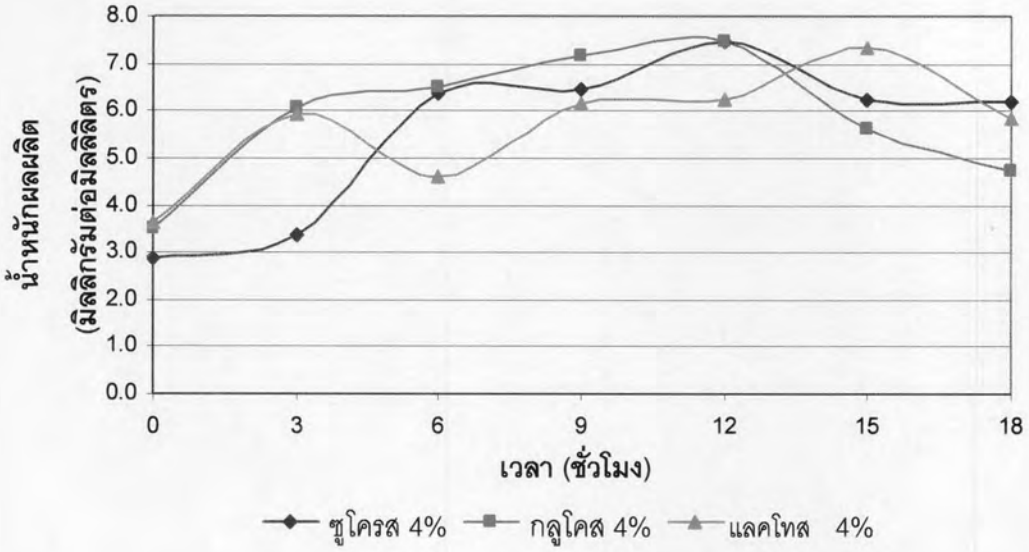


รูปที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

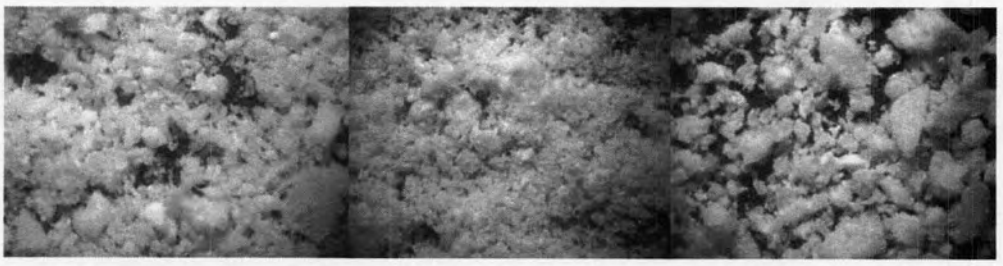


รูปที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าการใช้ซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงใกล้เคียงกัน แต่ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่ากลูโคส และลักษณะตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จะมีสีขาวกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอีกทั้งสองชนิดด้วย แสดงในรูปที่ 4.13 ดังนั้นซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด มีน้ำหนักผลผลิตเท่ากับ 7.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงคัดเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



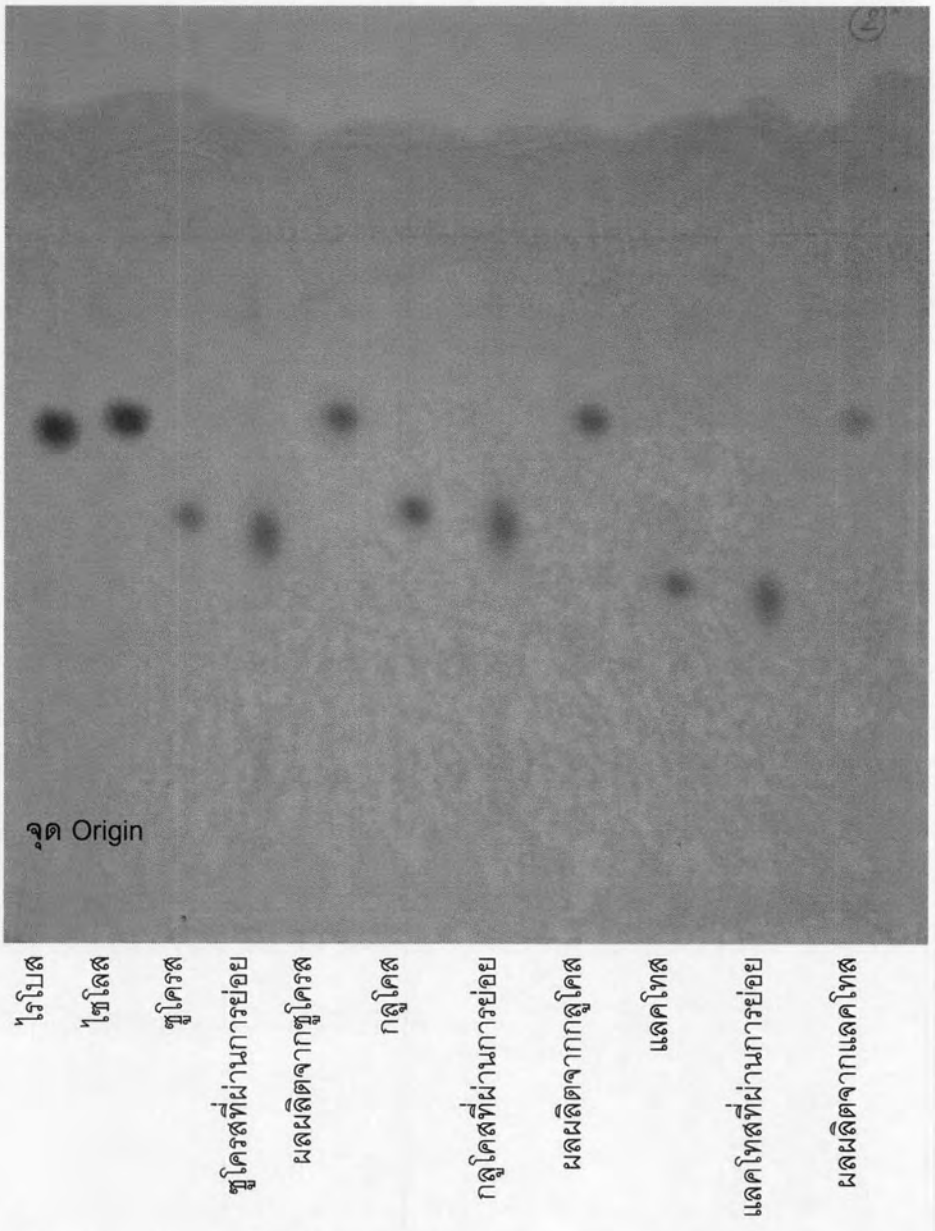
รูปที่ 4.12 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส โดยมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากัน ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



ก) ข) ค)

รูปที่ 4.13 ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนของ ก) ซูโครส ข) กลูโคส และ ค) แลคโทส

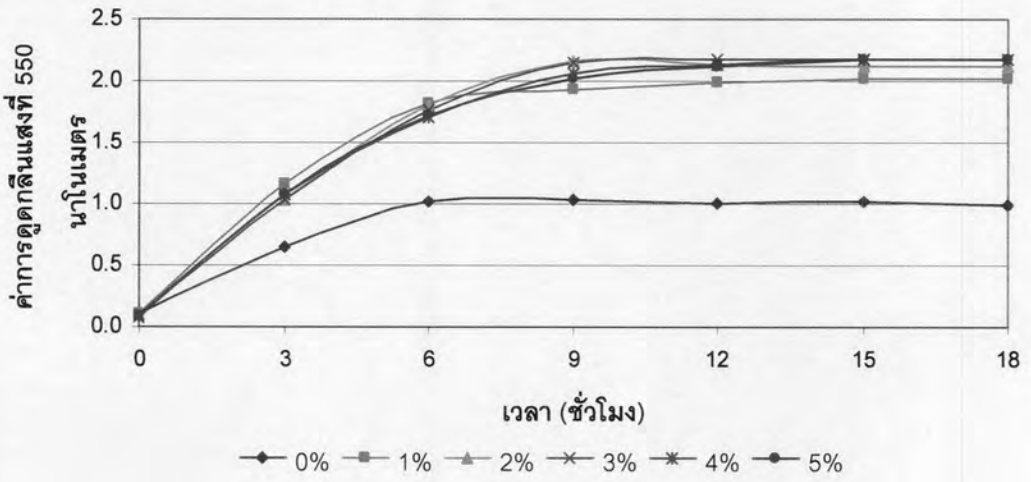
เมื่อนำผลผลิตจากแหล่งคาร์บอนทั้งสาม คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส หาส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 พบว่า มีไซโลสเป็นส่วนประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์เหมือนกันหมด แสดงดังรูปที่ 4.14



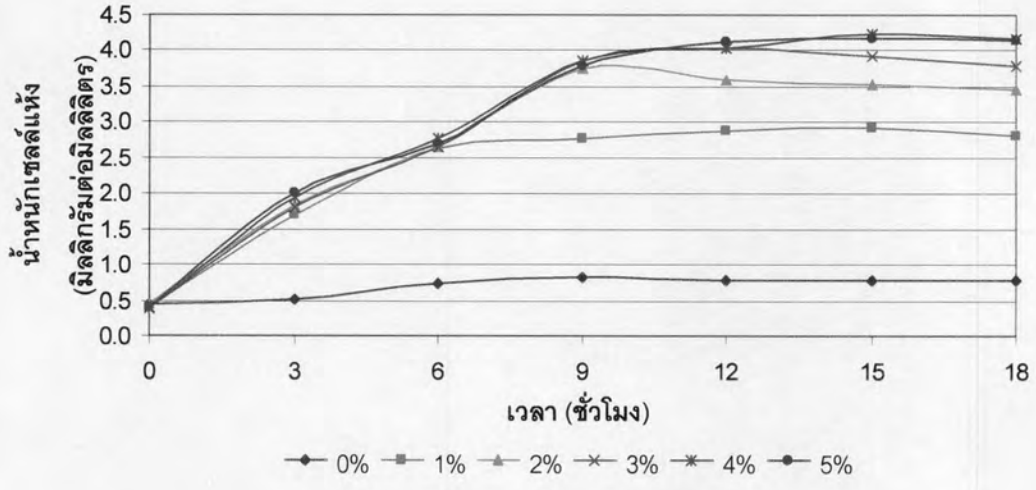
รูปที่ 4.14 แถบการเคลื่อนที่บน TLC (แผ่นซิลิกาเจล 60, บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม.) ของสารมาตรฐาน ตัวควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส กลูโคส และแลคโทส เป็นส่วนประกอบ) และผลผลิตจากแหล่งคาร์บอนทั้งสามชนิด ใช้ Butanol : Pyridine : 0.1 M HCl เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase)

4.5.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.7.2 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 และรูปที่ 4.16 พบว่าอัตราการเจริญของการใช้ซูโครสในแต่ละความเข้มข้นมีความสอดคล้องกัน โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสมากขึ้น จะมีการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย

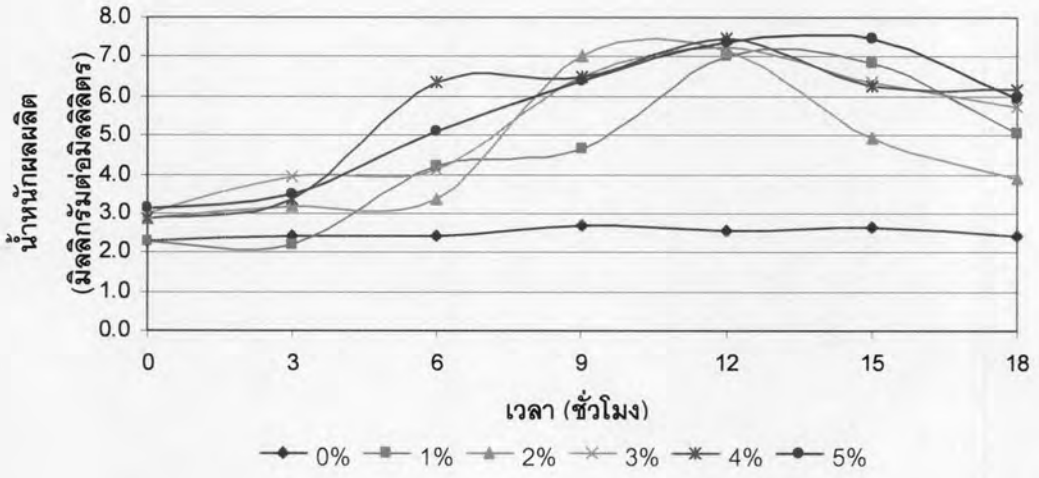


รูปที่ 4.15 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 4.16 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

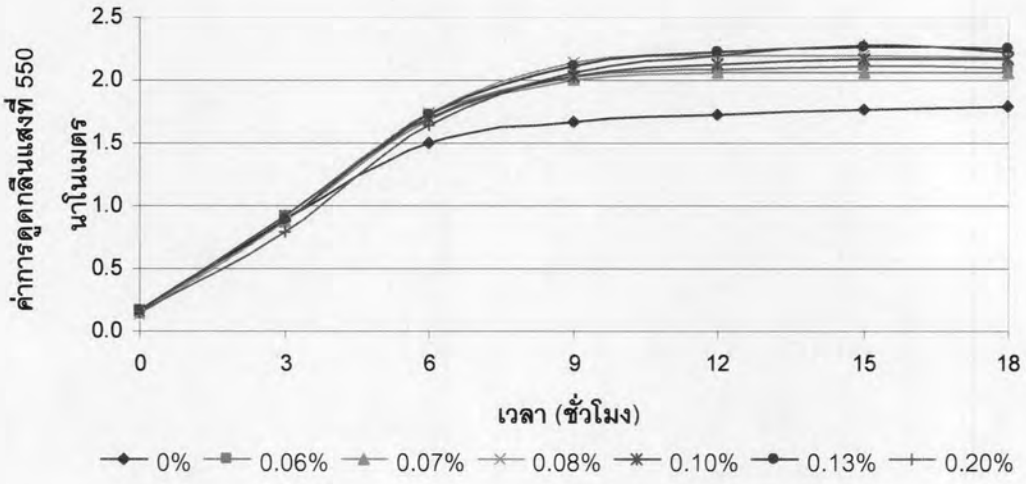
จากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่าการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 7.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกซูโครสที่ความเข้มข้น 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป



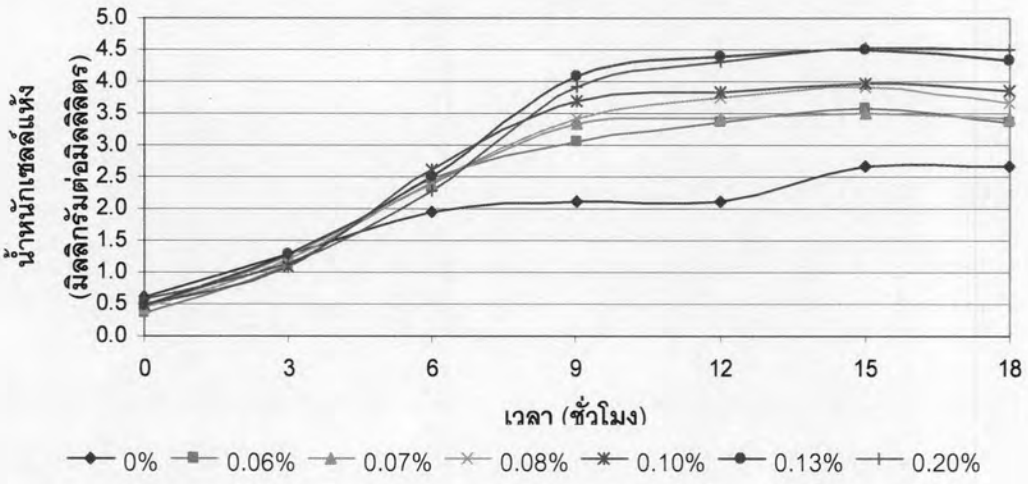
รูปที่ 4.17 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.5.3 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

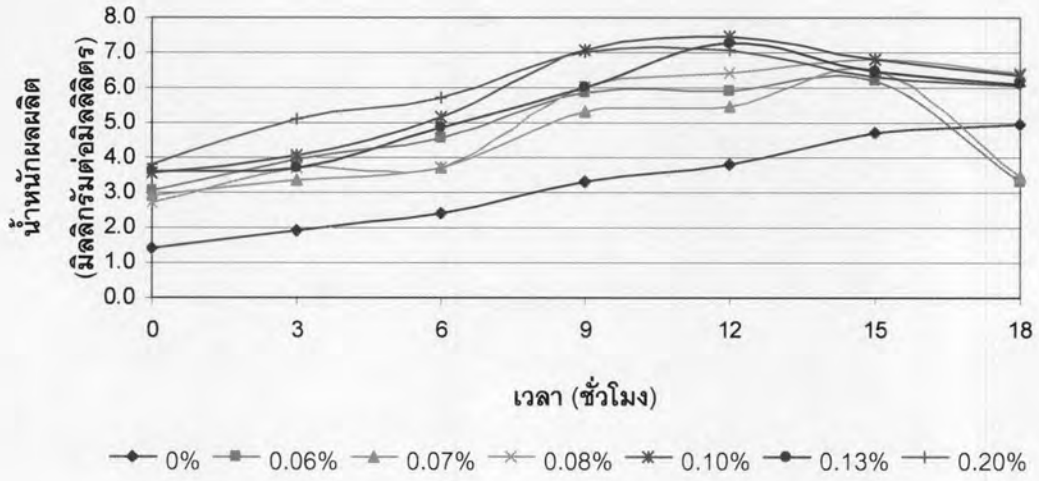
จากการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) โดยตรึงความเข้มข้นของซูโครสไว้ที่ 4.0% น้ำหนักต่อปริมาตรแต่แปรผัน $(NH_4)_2SO_4$ ที่แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 (คิดเป็น 0.2% , 0.13% , 0.1% , 0.08% , 0.067% และ 0.057%) ตามวิธีในข้อ 3.7.3 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.18 และรูปที่ 4.19 พบว่าการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยอัตราการเจริญของการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ แต่ละความเข้มข้นให้รูปแบบที่ใกล้เคียงกัน และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$



รูปที่ 4.18 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

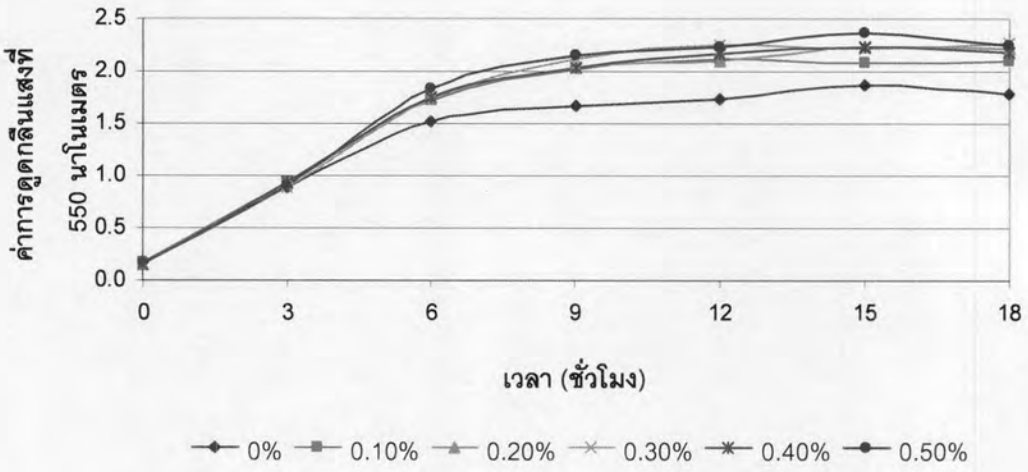


รูปที่ 4.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

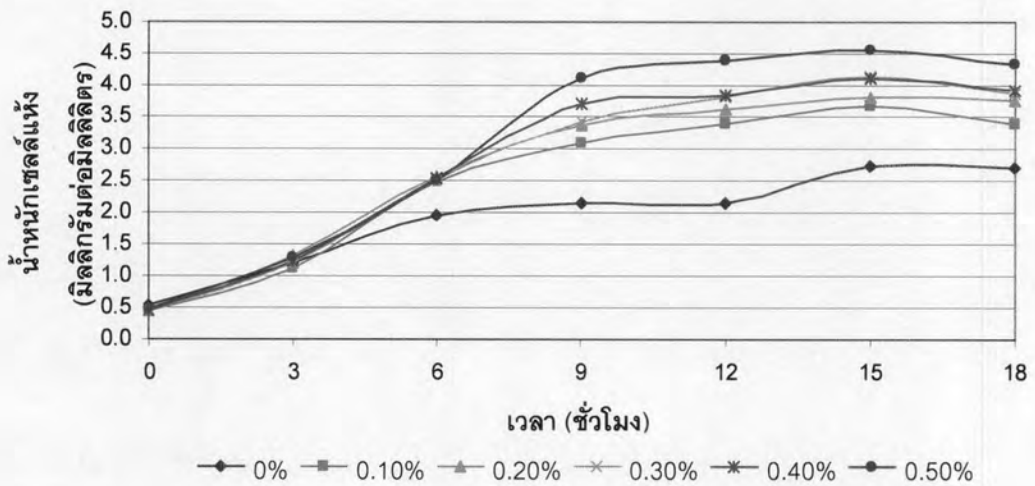


รูปที่ 4.20 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.7.3 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.21 และรูปที่ 4.22 พบว่าการแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดมีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยอัตราการเจริญของการใช้ยีสต์สกัดแต่ละความเข้มข้นให้รูปแบบที่ใกล้เคียงกัน และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการใช้ $(NH_4)_2SO_4$

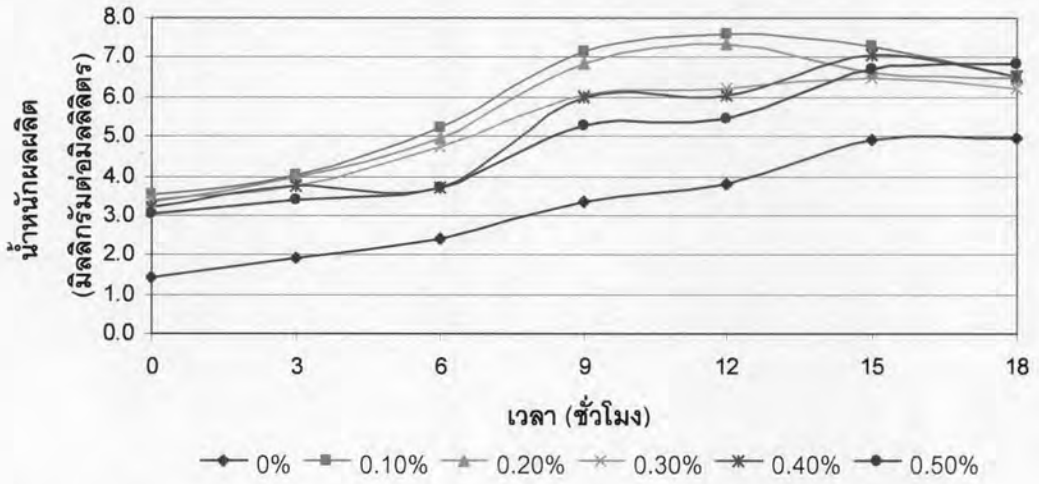


รูปที่ 4.21 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 4.22 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.20 และรูปที่ 4.23 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัดจะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง ซึ่งถ้าความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้จาก 7.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณเพิ่มเป็น 7.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือก $(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป



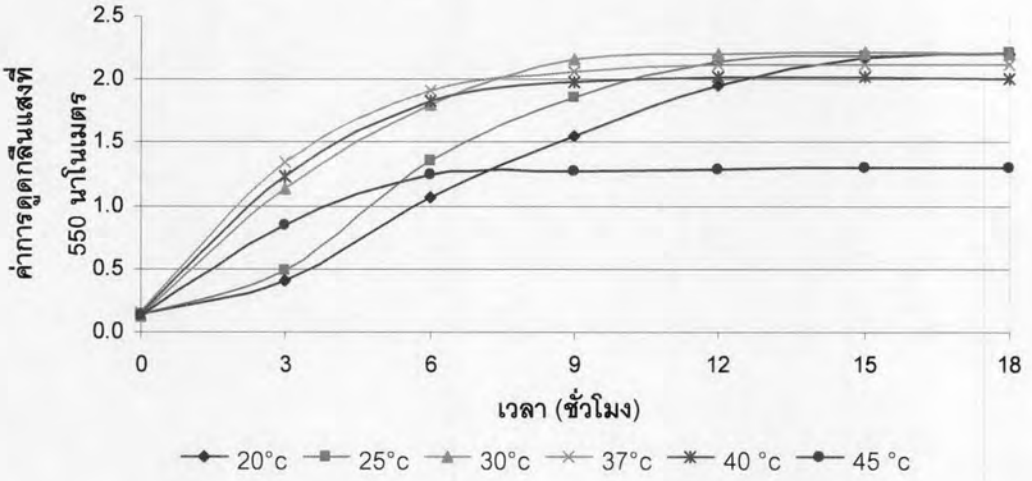
รูปที่ 4.23 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

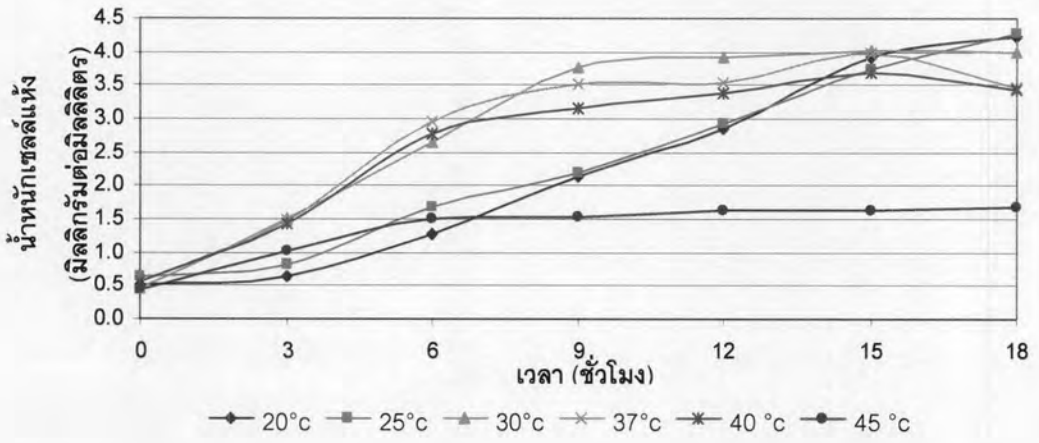
4.6.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัด อย่างละ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส ตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.24 และรูปที่ 4.25 พบว่าในช่วง

อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญในรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญต่ำสุด

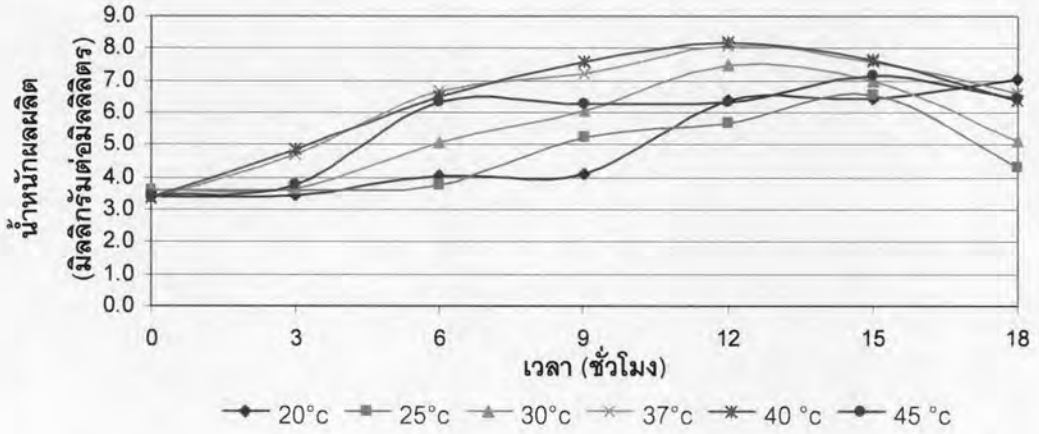


รูปที่ 4.24 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.25 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส

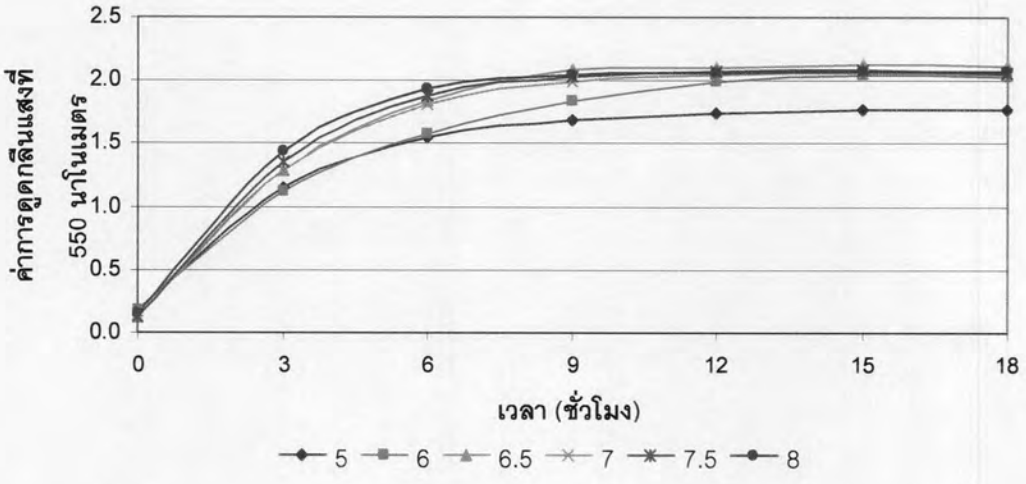
เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.26 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จะมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากมีน้ำหนักผลผลิตใกล้เคียงกัน (8.06 และ 8.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) แต่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 8.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่ 40 องศาเซลเซียส สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



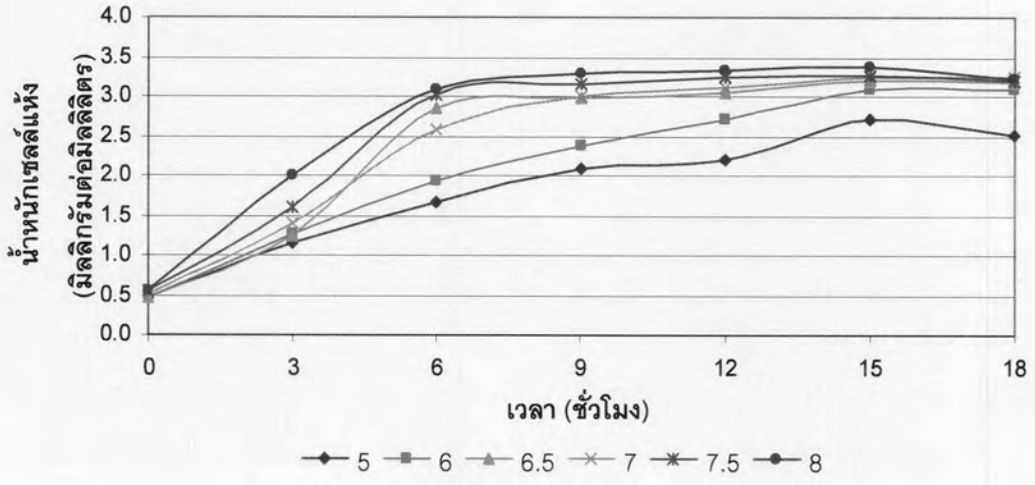
รูปที่ 4.26 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส

4.6.2 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัด อย่างละ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และปรับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อเป็น 40 องศาเซลเซียส โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 5.0-8.0 ตามวิธีในข้อ 3.3.8.2 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และชั่งน้ำหนักเซลล์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.27 และรูปที่ 4.28 พบว่า *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 6.5-8.0 โดยมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน

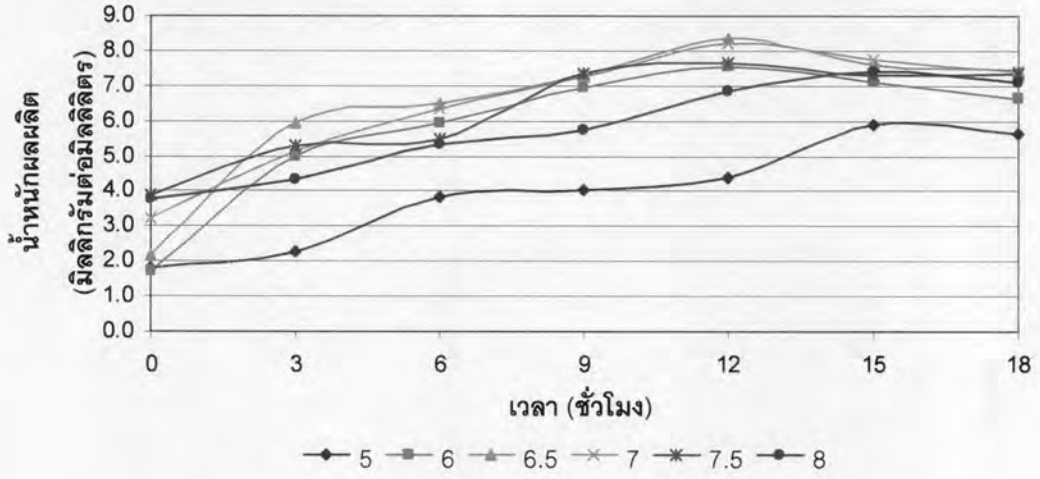


รูปที่ 4.27 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 5.0-8.0



รูปที่ 4.28 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 5.0-8.0

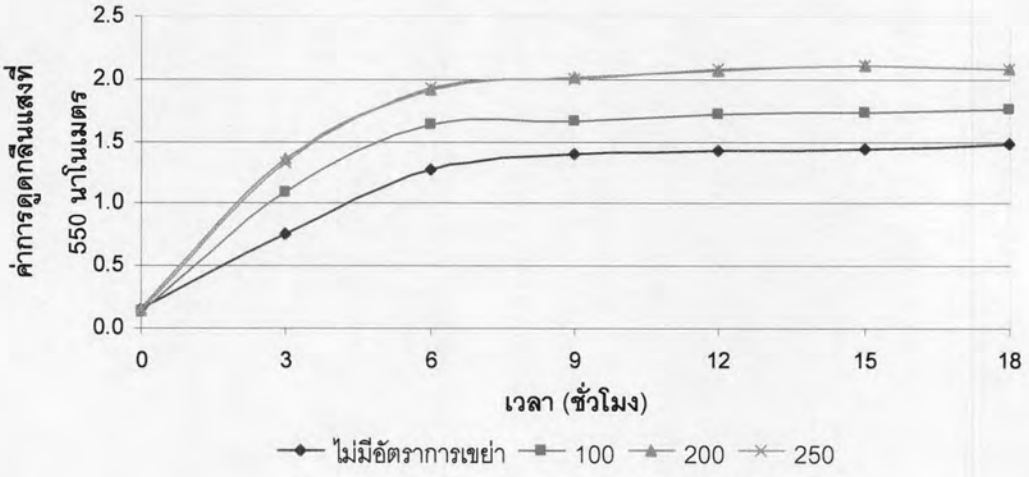
และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.29 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบส 6.5 และ 7.0 จะมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดเบสที่ 6.5 จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 8.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกค่าความเป็นกรดเบสที่ 6.5 สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



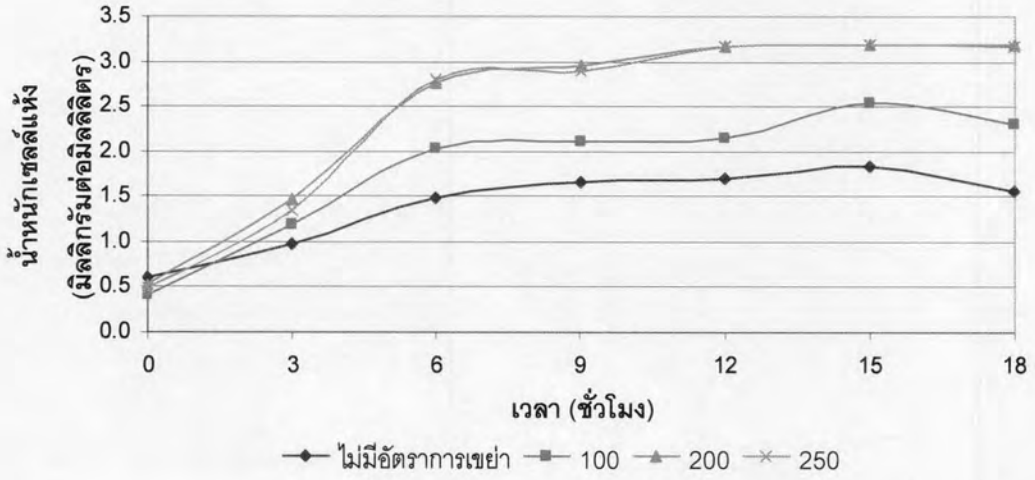
รูปที่ 4.29 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 5.0-8.0

4.6.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัด อย่างละ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที ตามวิธีในข้อ 3.8.3 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และชั่งน้ำหนักเซลล์ ได้ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 4.30 และรูปที่ 4.31 พบว่าความเร็วรอบที่ 200 และ 250 รอบต่อนาที จะมีอัตราการเจริญที่สูงใกล้เคียงกัน ส่วนที่ไม่ให้อากาศมีอัตราการเจริญต่ำสุด

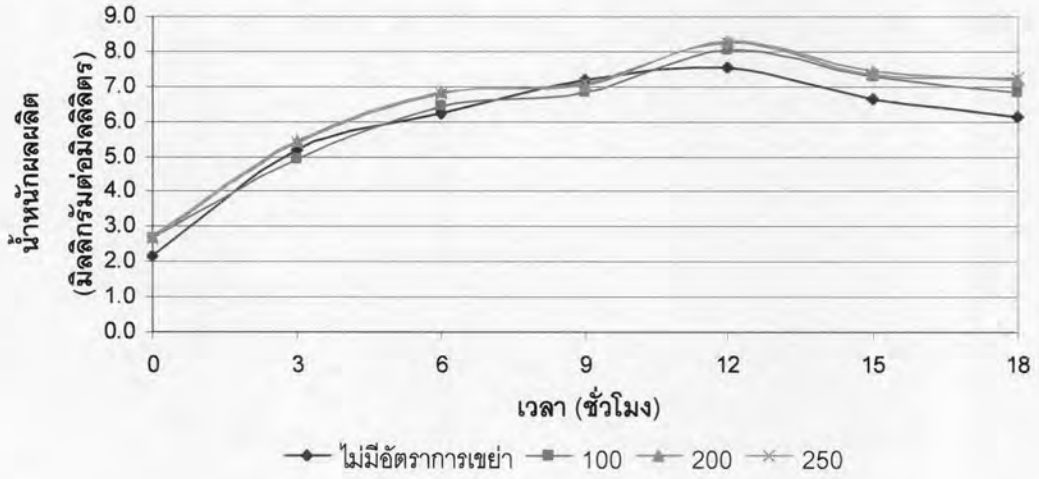


รูปที่ 4.30 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 6.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.31 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 6.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที

เปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.32 พบว่าในทุกความเร็วรอบจะมีอัตราการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 8.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกความเร็วรอบในการให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงต่อไป

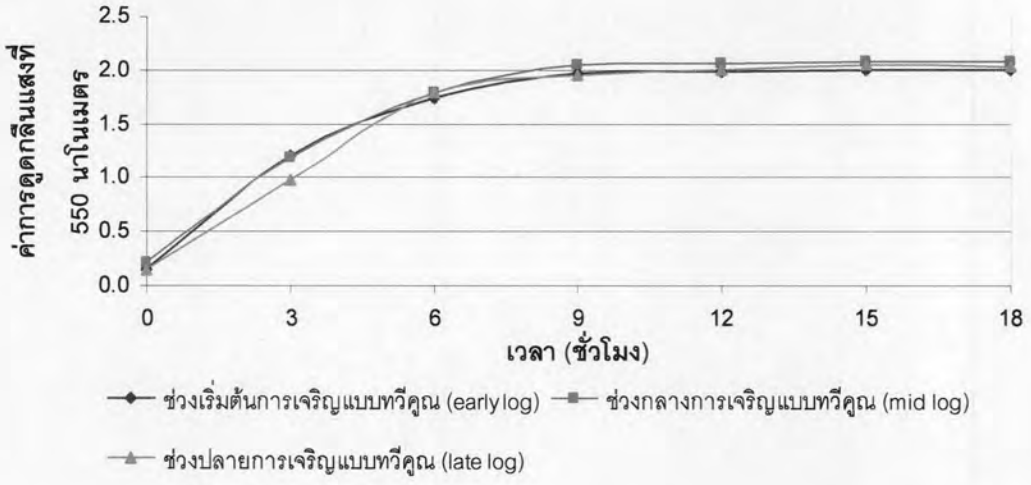


รูปที่ 4.32 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 6.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที

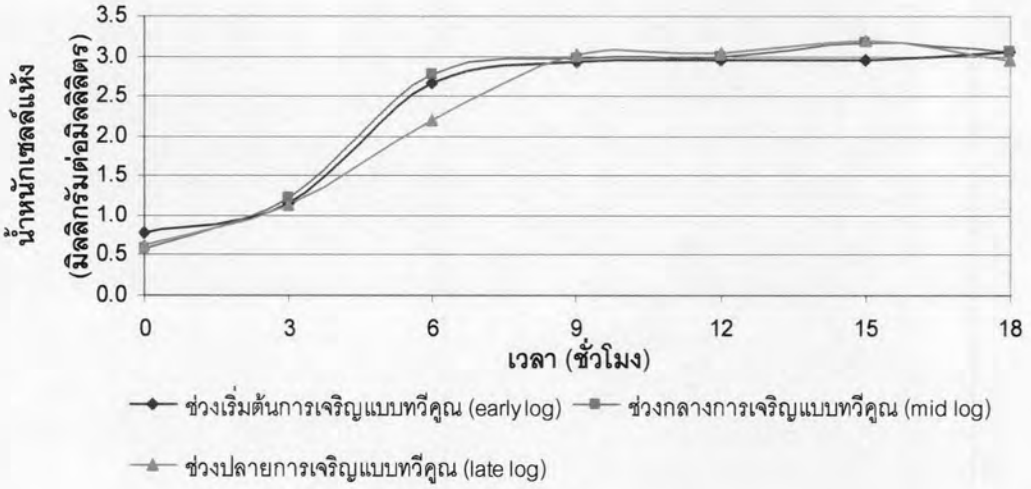
4.6.4 การเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ

ในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 มีค่าการดูดกลืนแสงมากสุดที่ประมาณ 2.0 แต่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงทำการเปลี่ยนอุณหภูมิช่วงเริ่มต้นของการเจริญแบบทวีคูณ (early log phase) ในชั่วโมงที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.559 ช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) ในชั่วโมงที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.974 และช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) ในชั่วโมงที่ 4.30 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 1.448 จากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในแต่ละช่วงของการเจริญแบบทวีคูณ จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และชั่งน้ำหนักเซลล์ ได้ผลการทดลองดัง

แสดงในรูปที่ 4.33 และรูปที่ 4.34 พบว่าในทุกช่วงของการเจริญแบบทวีคูณมีอัตราการเจริญสูงใกล้เคียงกัน โดยช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) มีอัตราการเจริญที่เร็ว และสูงกว่าช่วงเริ่มต้น (early log phase) และช่วงปลาย (late log phase) ของการเจริญแบบทวีคูณเล็กน้อย

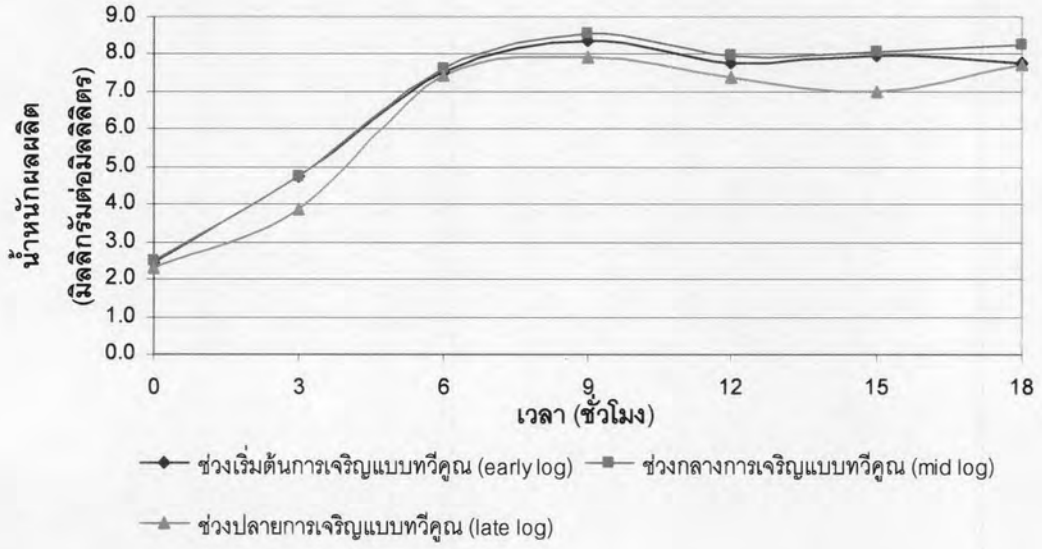


รูปที่ 4.33 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย



รูปที่ 4.34 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ โดยให้เซลล์เจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.35 ตารางที่ 4.9 และตารางที่ 4.10 พบว่า *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เร็วขึ้นจากชั่วโมงที่ 12 เป็นชั่วโมงที่ 9 และช่วงกลางการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงขึ้นจาก 8.32 เป็น 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ช่วงเริ่มต้นและกลางการเจริญแบบทวีคูณยังสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เร็วขึ้นจากชั่วโมงที่ 12 เป็นชั่วโมงที่ 9 และให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงด้วยเช่นกัน



รูปที่ 4.35 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.9 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณโดยเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ไปที่ 40 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ไปที่ 40 องศาเซลเซียส			ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
ช่วงระยะเวลา	ชั่วโมงที่เปลี่ยนอุณหภูมิ	ค่าการดูดกลืนแสง	
ช่วงเริ่มต้นการเจริญแบบทวีคูณ (early log phase)	1.00	0.559	8.39 (ชั่วโมงที่9)
ช่วงกลางการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase)	2.00	0.947	8.57 (ชั่วโมงที่9)
ช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase)	4.30	1.448	7.94 (ชั่วโมงที่9)

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และเวลาในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

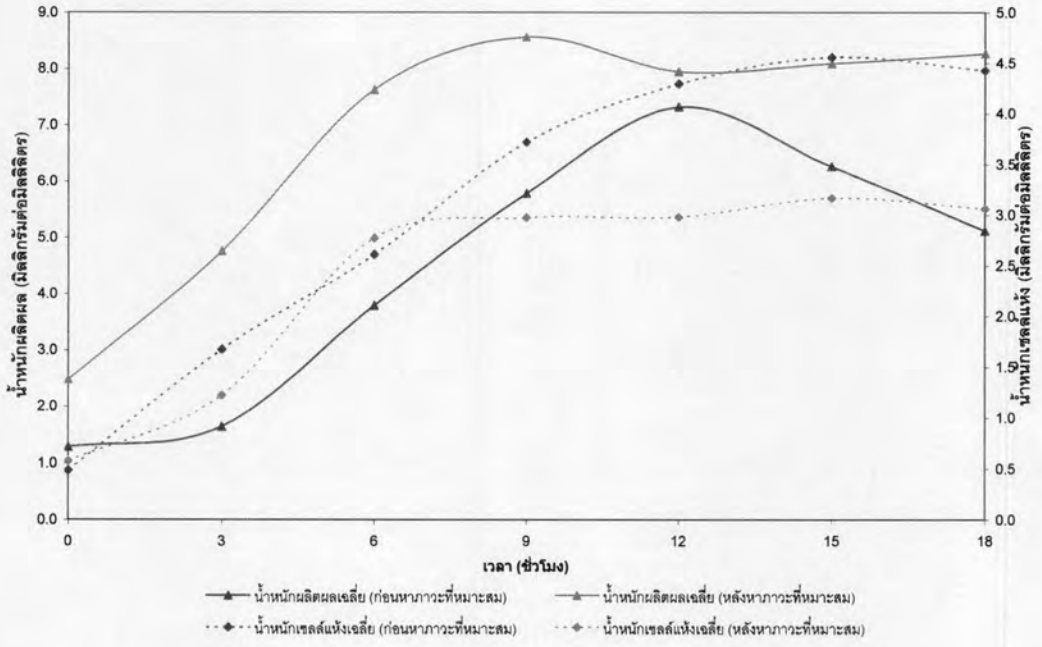
การเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ไปที่ 40 องศาเซลเซียส	เวลาในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
ไม่เปลี่ยนอุณหภูมิ (40 องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่ 12	8.32
เปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงกลางการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase)	ชั่วโมงที่ 9	8.57

ในการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัด อย่างละ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 บ่มให้เซลล์เจริญเติบโตดีที่สุด 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิไปที่ 40 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 ช่วงกลางการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) ให้มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงเท่ากับ 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ก่อนและหลังการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสม พบว่า หลังการปรับปรุงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้นในทุกชั่วโมง และเพิ่มจาก 7.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 เป็น 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 9 ซึ่งผลิตได้เร็วขึ้น และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงและคงที่ ซึ่งต่างจากก่อนปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงเรื่อยๆ ดังรูปที่ 4.36 ซึ่งการทดลองต่อไปจะนำพอลิแซ็กคาไรด์จากการปรับปรุงมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ พร้อมทั้งตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) และเครื่องสเปกโทรมิเตอร์

ตารางที่ 4.11 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% โดยปริมาตร

ชนิดและปริมาณของสูตรอาหาร รวมทั้งภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์						ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		pH	การให้อากาศ	
		เซลล์	ผลผลิต			
ซูโครส 4.0% โดยน้ำหนัก	$(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัด อย่างละ 0.1% โดยน้ำหนัก	30	40	6.5	200 รอบต่อนาที	8.57

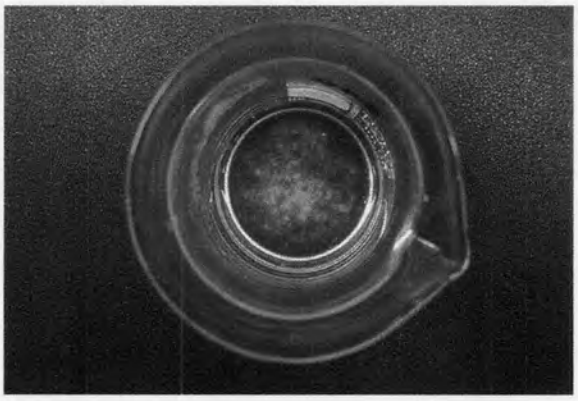


รูปที่ 4.36 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ก่อนและหลังการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.7 สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02

จากการวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีของ (Dubois และคณะ, 1956) มีค่าเท่ากับ 88.94 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธีของ (Bradford, 1976) มีค่าเท่ากับ 0.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากการปรับปรุง และผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ดังรูปที่ 4.37 พบว่ามีตะกอน แสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ดังแสดงในรูปที่ 4.38

รูปที่ 4.37 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02

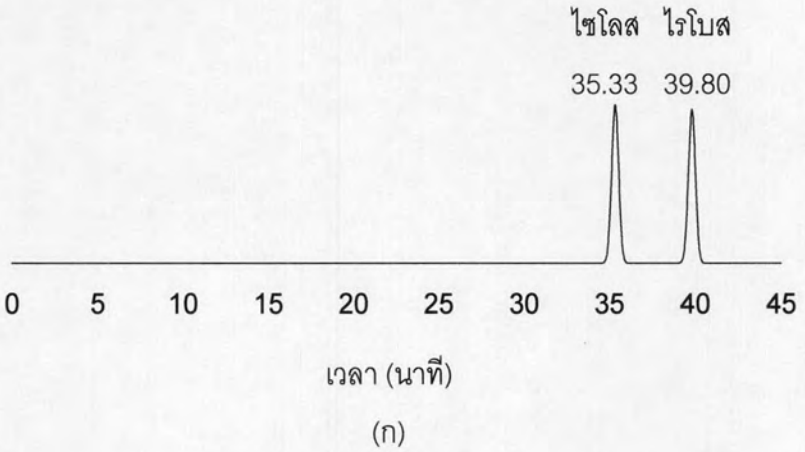


รูปที่ 4.38 ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่เกิดขึ้นจากการหาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

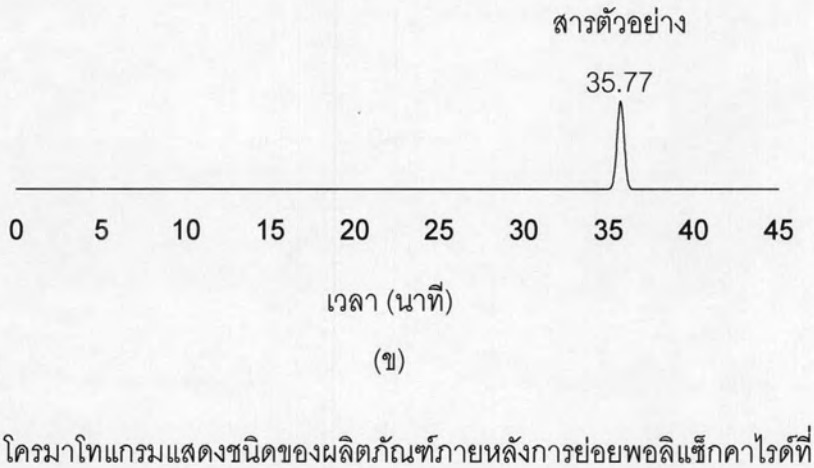
4.8 การหาส่วนประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02

4.8.1 วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.0 พร้อมทั้งกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.12 พบว่าการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะพบผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลไซโลสยู่เพียงชนิดเดียว ดังโครมาโทแกรมที่แสดงดังรูปที่ 4.39



(ก)



(ข)

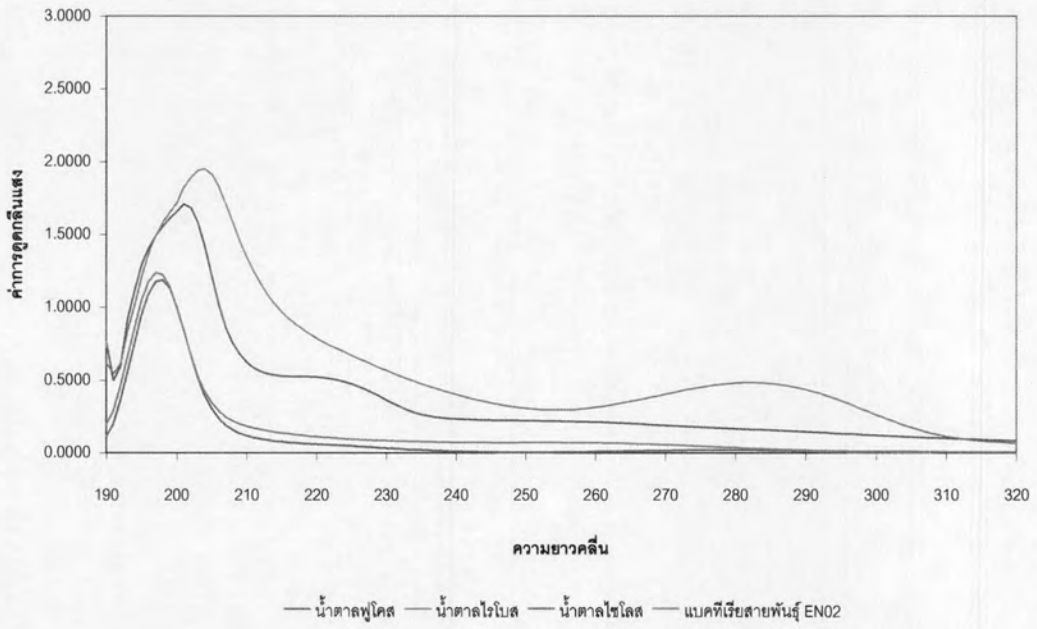
รูปที่ 4.39 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้น้ำกลั่นปลอดประจุ (DII) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

ก) สารมาตรฐานน้ำตาลไซโลสและไรโบส

ข) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

4.8.2 วัดโดยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์

จากการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยการสแกนหาความยาวคลื่นโดยโปรแกรม UV WINLAB ตามวิธีในข้อ 3.3.13 พบว่า มีน้ำตาลไซโลสอยู่เพียงชนิดเดียว เมื่อเทียบกับน้ำตาลไรโบส ไซโลส และฟูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลมาตรฐาน ดังโครมาโทแกรมที่แสดงดังรูปที่ 4.40



รูปที่ 4.40 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด