สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

พอลิแซ็กคาไรด์มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชที่ให้ความหวานที่ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ตัวอย่างอ้อย จำนวน 9 ตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามวิธีของ Tallgren และคณะ ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้งหมด 49 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปสลายด้วยกรด แล้วนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์เบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบ 24 สายพันธุ์ ที่มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ในจำนวนนี้มีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์ ในจำนวนนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่แยกได้จากอ้อย อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 7.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 1.68 มีลักษณะเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเพียงตัวเดียวเป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ จึงคัดเลือกสายพันธุ์ EN02 ไปศึกษาทางอนุกรมวิธานและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

จากงานวิจัยของ Tallgren และคณะ (1998) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร ในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างน้ำตาลหัวบีท ได้ลักษณะโคโลนีที่มีเมือกเยิ้มจำนวน 170 โคโลนี จาก 600 โคโลนี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Morin และคณะ (1993) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและเหลวที่มีน้ำตาลซูโครสในน้ำยางของต้นเมเปิลที่เข้มข้นปริมาณ 30 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงใช้อาหารนี้สำหรับคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา อ้างอิงตาม Clinical and Pathogenic Microbiology (Howard, 1994) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) พบว่ามีลักษณะกลมรี สีขาวครีม โคโลนีนูน มันวาว ขอบเรียบ และทึบแสง ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียเป็นแท่งสั้น ขนาดกว้าง 0.8-1.0 ไมครอน และ ยาว 1.0-2.0 ไมครอน ไม่มีการสร้างสปอร์ จากการศึกษาทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) โดยพิจารณาจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และความสามารถในการหมักน้ำตาล (ตารางที่ 4.6) สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ได้เป็น *Enterobacter cloacae* จากนั้นจำแนกสกุลโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ความยาว 1,456 bp ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* โดยมีความคล้ายกับ *Enterobacter cloacae* (Muniyandi และคณะ, 2006) 98.97% และ *Enterobacter cancerogenus* 98.73% (Hauben, และคณะ, 1998) และเมื่อสร้าง phylogenetic tree พบว่า 16SrDNA ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกันมาก แต่เนื่องจากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีตรงกับ *Enterobacter cloacae* จึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เป็นจุลินทรีย์ *Enterobacter cloacae*

แบคทีเรียสกุล *Enterobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีก็ได้ จัดอยู่ในแฟมิลี *Enterobacteriaceae* ซึ่ง *Enterobacter* มีแบคทีเรียร่วมสปีชีส์ เช่น *Enterobacter agglomerans* *Enterobacter cloacae* *Enterobacter aerogenes* และ *Enterobacter gergoviae* เป็นต้น ความแตกต่างทางชีวเคมี และเทคนิคทางโมเลกุลสามารถจำแนกสปีชีส์เหล่านี้ได้ (Farmer และคณะ, 1980; Farmer และ Kelly, 1992; HoVmann และ Roggenkamp, 2003; Iversen และคณะ, 2004d) Kandhai และคณะ(2004a) และNeelam และคณะ(1987) รายงานว่าสายพันธุ์ *Enterobacter* แยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมถึง ดิน พืช ผลไม้ โรงงานนม และโรงงานช็อกโกแลต เป็นต้น ปัจจุบันมีรายงานถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ เช่น *Enterobacter sakazakii* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป(Heteropolysaccharide) ประกอบด้วย กาแลคโทส ฟรุคโทส กลูโคส กลูคิวโรนิก แอซิด และอะซิเตท (Sheepe-Leberkuhne และ Wagner, 1986) *Enterobacter agglomerans* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (Neutral polysaccharides) ประกอบด้วย กลูโคสและกาแลคโทส (Yoo และ Chnng,

1989) และ *Enterobacter cloacae* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (Acidic polysaccharides) ประกอบด้วย ฟูโคส กาแลคโทส กลูโคส กลูคิวโรนิก แอซิด ไพรูเวต และอะซิเตท (Nishikawa และคณะ, 1979) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter* สามารถรวมตัวเป็นเจลได้ ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส ฟูโคส และกลูคิวโรนิก แอซิด (Nisbet และคณะ, 1984)

รูปแบบการเจริญของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ควบคู่กันไป เรียกว่า Growth-associated จึงสรุปได้ว่า พอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารเมแทบอไลต์แบบปฐมภูมิ (Primary metabolite) โดยมีรูปแบบการเจริญในระยะเริ่มต้นที่ค่อนข้างสั้น และเข้าสู่ภาวะคงที่ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดปริมาณ 7.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรน้ำเลี้ยงเชื้อ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงเรื่อยๆ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้ เมื่อแบคทีเรียขาดแคลนอาหารแล้วนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นกลับมาใช้ใหม่ โดยเมื่อบ่มต่อไปจนกระทั่งครบ 72 ชั่วโมง จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีผู้ศึกษาถึงการเลี้ยง *Enterobacter* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะใช้เวลาในการบ่มเชื้อที่แตกต่างกันไปตั้งแต่ 48 ชั่วโมง ถึง 12 วัน (Morin และคณะ, 1993; Takeda และคณะ, 1994; Shimada และคณะ, 1997; Tallgren และคณะ, 1998; Prasertsan และคณะ, 2006) โดย Prasertsan และคณะ (2008) ได้รายงานการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 พบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในช่วงระยะเวลา 6-72 ชั่วโมง และมีความสอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มต่อไปจะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เช่นกัน Prasertsan และคณะ (2006) เลี้ยงแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 *Pseudomonas alcaligenes* สายพันธุ์ WD22 และ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ WD50 จากอาหารที่ใช้กลูโคส (สายพันธุ์ WD7 และ WD22) หรือซูโครส (สายพันธุ์ WD50) เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน และศึกษาถึงการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญเหมือนกันโดยเจริญได้รวดเร็วภายใน 1 วัน ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 และจะมีปริมาณลดลงทีละน้อยจนกระทั่งครบ 5 วัน

จากการพิจารณาองค์ประกอบของอาหารดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ซึ่งใช้ในการคัดแยกเชื้อดังที่กล่าวมาตอนต้น ในสูตร

อาหารนี้ใช้ซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อดูส่วนประกอบพบว่า สูตรอาหารนี้มีองค์ประกอบง่าย และมีความเหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ จึงเลือกสูตรอาหารนี้เป็นสูตรเริ่มต้นเพื่อการปรับปรุงต่อไป ซึ่งเริ่มตั้งแต่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และภาวะที่ใช้ในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 การทดลองเริ่มต้นจากการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการปรับสูตรอาหารดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำตาลที่เลือกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองนี้ คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส พบว่าการใช้ซูโครส และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน แต่เจริญได้ดีกว่าการใช้แลคโทส เมื่อใช้ซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงใกล้เคียงกัน แต่ในแง่ของคุณภาพผลผลิต พบว่าการใช้ซูโครสนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะมีลักษณะทางกายภาพ คือ สีและความละเอียดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ดีกว่าการใช้กลูโคสและแลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ได้หาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนทั้งสาม พบว่า พอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากแหล่งคาร์บอนทั้งสามชนิด (ซูโครส กลูโคส และแลคโทส) ไม่เปลี่ยนชนิดหรือองค์ประกอบ การทดลองต่อไปจึงใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยปกติการเจริญของเซลล์และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนซึ่งส่งผลต่อคุณภาพ องค์ประกอบและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ (Wachenheim และ Patterson, 1992) Sutherland (1972) กล่าวว่าโดยทั่วไป องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ไม่ขึ้นกับองค์ประกอบของอาหาร แต่โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียที่มีเมือกเหนียวจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ภายใต้ภาวะเลี้ยงเชื้อต่างๆ ซึ่งปริมาณและองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์มีผลมาจากภาวะการหมัก และองค์ประกอบของอาหาร แต่มีรายงานของ Looijesteijn และ Hugenholtz (Looijesteijn และ Hugenholtz, 1999) ได้รายงานว่าไม่ส่งผลต่อน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส กาแลคโทส และแรมโนส ในอัตราส่วน 2.2:1.3:1.0 จากงานวิจัยของ Prasertsan และคณะ (2008) ได้ศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนต่างๆที่ 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 พบว่า ซูโครสและกาแลคโทสให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงใกล้เคียงกัน และสูงกว่าการใช้มอลโทส ฟรุคโทส และกลูโคส จึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากราคาถูกกว่ากาแลคโทส Takeda และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียสกุล *Enterobacter* มีอัตราการเจริญต่ำ และแทบจะไม่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อใช้แลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าฟรุคโทสเหมาะสมที่สุด

สำหรับการเจริญของเซลล์และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ แต่เนื่องจากการหาปริมาณทำได้ยากมาก ดังนั้นในการศึกษาจึงใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อแปรผันปริมาณของซูโครสตั้งแต่ 0.0-5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส แต่หากความเข้มข้นของซูโครสมากกว่า 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้ว จะไม่มีผลเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงเท่ากับ 7.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรน้ำเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ Cerning (1990) ได้กล่าวว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะสูงเมื่อปริมาณน้ำตาลมีมากพอ ซึ่งเป็นเพราะน้ำตาลซูโครสเป็นสับเสตรทสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมากเกินพอ จะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ค่อนข้างต่ำลง เนื่องจากเชื้ออาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งอาจเป็นเพราะมีปริมาณของแข็ง (Total solid) มากเกินไป Prasertsan และคณะ (2008) ได้ศึกษาว่าการเพิ่มปริมาณซูโครส (1.0-4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ส่งผลให้เพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เช่นกัน โดยพบว่าการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 ปริมาณซูโครสที่ 3.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในขณะที่ 2.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เหมาะสำหรับ *Agrobacterium tumefaciens* (Stredansky และ Conti, 1999) 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เหมาะสำหรับ *Lactobacillus* สายพันธุ์ LB 80 (Geel-Schutten และคณะ, 1998) และ 2.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เหมาะสำหรับ *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ CG11 (Cerning และคณะ, 1994)

การแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเพิ่มปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัด เนื่องจากยีสต์สกัดมีน้ำตาลและวิตามิน ช่วยเร่งการเจริญด้วย เมื่อแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 0-70 (คิดเป็น 0% ,0.2% , 0.13% , 0.1% , 0.08% , 0.067% และ 0.057%) และแปรผันปริมาณยีสต์สกัดระหว่าง 0%-0.5% พบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัด แต่หากความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัดมากกว่า 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้ว จะไม่มีผลเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ หลังการเลี้ยงพบว่าใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ซึ่งแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ 40 (คิดเป็น 0.1%) ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงเท่ากับ 7.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรน้ำเลี้ยงเชื้อ และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเป็น 7.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรน้ำเลี้ยงเชื้อ Lo และคณะ(1997) ได้เสนอการใช้อัตราส่วนคาร์บอน

ต่อไนโตรเจนที่สูง (60 ต่อ 1) ในอาหาร พบว่าให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น แต่มีการเจริญของเซลล์ต่ำลง เพราะวิถีทางสำหรับการเจริญของเซลล์ถูกหยุดลง และเปลี่ยนไปเป็นวิถีทางการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตามแหล่งไนโตรเจนควรจะมีพอเมื่อเริ่มต้นเข้าสู่ stationary phase ซึ่งถ้ามีปริมาณไนโตรเจนในอาหารสูงจะส่งผลให้การผลิตแซนแทนต่ำ Prasertsan และคณะ (2008) ได้รายงานว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ [NH_4Cl NH_4NO_3 $(NH_4)_2SO_4$] หรือแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (polypeptone) พบว่ามีอิทธิพลต่อการเจริญของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 ซึ่งมีการเจริญสูงสุดเมื่อเติม 0.05% NH_4Cl มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.78 และ 0.3% polypeptone มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.67 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารไม่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในสูตรอาหารก็เพียงพอ (0.2% polypeptone และ 0.05% yeast extract) เช่นเดียวกับการเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (0.2% NH_4NO_3) (Lawson และ Sutherland, 1978) ยูเรีย และโพแทสเซียมไนเตรต สามารถเพิ่มการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Erwinia herbicola* และ การผลิตสารดูดซับทางชีวภาพโดย *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ B-16 (Nohata และ Kurane, 1994) นอกจากนี้เมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัด จะส่งผลให้การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ WD7 ลดลง แต่ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี (Prasertsan และคณะ, 2008)

การทดลองต่อไปคือ การปรับปรุงการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการหาภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส และอัตราการเขย่าเพื่อให้อากาศ การทดลองจึงใช้เพียง $(NH_4)_2SO_4$ มาปรับปรุงภาวะการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบส 6.5 ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูง ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 8.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงศึกษาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณโดยเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ไปที่ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ช่วงกลางการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) ในชั่วโมงที่ 9 ให้พอลิแซ็กคาไรด์ได้เร็วขึ้นกว่าเดิมและมีปริมาณสูงที่สุด ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีการกล่าวไว้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ (Prasertsan และคณะ, 2008) โดยมีการอธิบายเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียพวกแลคติก แอซิดต้องต่ำกว่าอุณหภูมิในการเจริญ ซึ่งมีความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ต่ำกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดี (Sutherland, 1990) แต่เชื้อ *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ CG11 เป็นเชื้อที่แยกได้จากชีส พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้

สูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสถึง 50 เท่า โดยพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูง (Garcia และคณะ, 1991) Lawson และ Sutherland (1978) ได้รายงานว่าอุณหภูมิในการบ่มเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าส่วนใหญ่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส เป็นพวก mesophiles จากการศึกษาค่าความเป็นกรดเบสได้กล่าวไว้ว่า ช่วงค่าความเป็นกรดเบสระหว่าง 6.0-7.5 เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Lawson และ Sutherland, 1978) ซึ่งปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด เนื่องจากค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิต (Jeanes, 1977) *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 มีสมบัติเป็น facultative anaerobe ทำให้การเขย่าเพื่อให้อากาศแก่แบคทีเรียไม่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ จึงทำให้ไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานและลดต้นทุนการผลิตได้ ทำให้เป็นข้อได้เปรียบกว่าการผลิตแซนแทนกัม ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Xanthomonas camprestis* ที่จำเป็นต้องใช้อากาศในการเจริญ และเมื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ไปได้ระดับหนึ่ง อาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดความหนืดมากทำให้ต้องใช้พลังงานมากในการกวนทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน (Mcneil และ Harvey, 1993) นอกจากนี้มีการศึกษาผลของความเร็วรอบ พบว่าผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และการเจริญลดลงเมื่อเพิ่มความเร็วรอบจาก 200 เป็น 800 รอบต่อนาที (Prasertsan และคณะ, 2008)

การศึกษาถึงชนิดและปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยสกุล *Enterobacter* สายพันธุ์ต่างๆ มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้โดยจะเปรียบเทียบดังแสดงในตารางที่ 5.1 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบถึงการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งในเรื่องของชนิดและปริมาณซูโครสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ผลผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์และเวลาดังนี้

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของสกุล *Enterobacter* สายพันธุ์ต่างๆ

จุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	รายการอ้างอิง
Enterobacter gergoviae	ซูโครส 2.0%	144	3.25	Takeda และคณะ, 1994
Enterobacter sp.	ซูโครส 13.5%	72	5.8	Shimada และคณะ, 1997
Enterobacter amnigenus	ซูโครส 4.0%	35	0.153	Tallgren และคณะ, 1998
Enterobacter cloacae สายพันธุ์ WD7	กลูโคส 1.0%	120	2.27	Prasertsan และคณะ, 2006
Enterobacter agglomerans สายพันธุ์ WD50	ซูโครส 1.0%	120	0.83	Prasertsan และคณะ, 2006
Enterobacter cloacae สายพันธุ์ WD7	กลูโคส 1.0%	72	2.23	Prasertsan และคณะ, 2008 ก่อนการปรับปรุง
Enterobacter cloacae สายพันธุ์ WD7	ซูโครส 3.0% (ในระบบถังหมัก)	72	4.8	Prasertsan และคณะ, 2008
***Enterobacter cloacae* สายพันธุ์** EN02	**ซูโครส** 4.0%	18	8.57	**งานวิจัยนี้**

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงกว่า *Enterobacter* สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ศึกษาก่อนหน้านี้ และนอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบกว่าในเรื่องระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่น้อยกว่า รวมทั้งผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้รับ

สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 88.94 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีน มีค่าเท่ากับ 0.29 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน วิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) Nishikawa และคณะ (1979)) ได้รายงานว่า *Enterobacter cloacae* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (Acidic polysaccharides)

เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีต่างๆ ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี หลังการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่มีค่าเวลารีเทนชันเท่ากับตำแหน่งของไซโลสมาตรฐาน และการสแกนหาความยาวคลื่นด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ ใช้โปรแกรม UV WINLAB พบว่าความยาวคลื่นของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ตรงกับน้ำตาลไซโลสที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน จึงสรุปได้ว่าพอลิเมอร์ที่ได้นี้มีส่วนประกอบเป็นไซโลส ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบ Takeda และคณะ (1994)) กล่าวว่าไม่มีรายงานการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวในสกุล *Enterobacter* สายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) ที่มีประจุลบ แต่ไม่สามารถระบุโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR (Nuclear Magnetic Resonance) และวิธีทางเคมีอื่นๆต่อไป

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงว่าแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยมีมอโนแซ็กคาไรด์ คือ ไซโลส เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำแบคทีเรียไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

1 ควรมีการศึกษาถึงแหล่งอาหาร และแหล่งวิตามินที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น รวมทั้งศึกษาลักษณะพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ทางด้านต่างๆให้มากกว่านี้ เช่น หาน้ำหนักโมเลกุล สมบัติด้านความหนืด เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ในงาน หรืออุตสาหกรรมต่างๆ

2 ควรศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรม เช่น ปรับปรุงในระดับพันธุกรรม โดยการกลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV หรือสารเคมีบางชนิด เช่น NTG หรือ EMS เป็นต้น เพื่อนำไปใช้เพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้

3 ควรพัฒนาการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วัตถุดิบในรูปสารเหลือใช้ทางการเกษตร จะเป็นการผลิตสารเหล่านี้ได้เองในประเทศเป็นการทดแทนการนำเข้า และยังอาจได้สารชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์ได้ด้วย ทำให้ผลผลิตมีราคาถูกลงสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นได้