# การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้

นางสาวสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ISOLATION OF POLYSACCHARIDE-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE POLYSACCHARIDE THEREOF

Miss Somruedee Choonharojrith

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

512080

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ |
| โดย | นางสาวสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ |
| สาขาวิชา | จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

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

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป)

สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ : การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้. (ISOLATION OF POLYSACCHARIDE-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE POLYSACCHARIDE THEREOF) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, 183 หน้า.

แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คัดแยกและคัดเลือกได้จากอ้อยในจังหวัดนครปฐม เมื่อวิเคราะห์พอลิเมอร์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดโดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.7091 ส่วนประกอบของอาหารและภาวะการเจริญสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ คือ อาหารสูตรดัดแปลงรวมของ Bromfield และ Tallgren ที่ประกอบด้วย ซูโครสความเข้มข้น 4.0% โดยน้ำหนัก $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1.0% และยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% โดยน้ำหนัก $K_2HPO_4$ 0.9% โดยน้ำหนัก และ $KH_2PO_4$ 0.3% โดยน้ำหนัก ภายใต้ภาวะที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ด้วยอัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อการเจริญที่เหมาะสม จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิไปที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อการผลิตพอลิเมอร์ แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 8.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ประกอบด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 88.94 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีน 0.29 เปอร์เซ็นต์

วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และการหาความยาวคลื่นด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ เพื่อตรวจสอบชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ย่อยสลายด้วยกรด ซึ่งให้ความเชื่อมั่นจากขั้นตอนวิเคราะห์ด้วย TLC เบื้องต้นที่มีไซโลสเป็นส่วนประกอบ การศึกษาทางอนุกรมวิธาน โดยดูลักษณะรูปร่าง ลักษณะทางชีวเคมี และการจัดกลุ่มด้วย 16SrDNA พบว่าสายพันธุ์ EN02 เป็น *Enterobacter cloacae*

ภาควิชา : .....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต : .....

สาขาวิชา : ..จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.. ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : .....

ปีการศึกษา : ..... 2551 .....

## 4872495723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: EXOPOLYSACCHARIDE / ISOLATION / CHARACTERIZATION

SOMRUEDEE CHOONHAROJRITH : ISOLATION OF POLYSACCHARIDE-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE POLYSACCHARIDE THEREOF. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., 183 pp.

Bacterial strain EN02, an exopolysaccharide producing bacterium was isolated and screened from sugar cane in Nakhon Pathom Province. Analysis of polymer upon acid hydrolysis via thin layer chromatography suggested the content of xylose with $R_f$ value of 0.7091. Medium composition and growth conditions for growth and polymer production are: modified medium of Bromfield and Tallgren consist of 4% (w/v) sucrose, 0.1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ and 0.1% (w/v) yeast extract, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.9% $K_2HPO_4$ and 0.3% $KH_2PO_4$ with initial pH of 6.5 while shaken at 200 rpm at 30°C for 2 hours for optimal growth then shift to 40°C for 16 hours for polymer production. Under such condition, strain EN02 was able to produce polysaccharide at 8.57 mg/ml. The obtained polysaccharide was characterized as acidic polysaccharide composed of 88.94 % total sugar and 0.29% protein.

HPLC profile and Ultraviolet-visible light spectroscopy of its acid hydrolysate comfirmed result from earlier analysis via TLC of xylose in its content. Taxonomic studies via its morphological, biochemical and 16SrDNA classified the strain EN02 as member of *Enterobacter cloacae*.

Department : Microbiology ..... Student's signature : .....

Field of study : .Industrial Microbiology. Thesis Principal Advisor's signature : .....

Academic year : ..2008.....

# กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุน ช่วยเหลือในทุกๆด้าน และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณคุณภิสิทธิ์ กรรณสูต ที่อยู่เคียงข้างคอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีให้ตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ณฤดี อัศวเสรีเลิศ พี่ปาริฉัตร ราวีศรี คุณฉวีวรรณ ปันคำ คุณพาคินทร์ เจริญทิพย์ คุณกมล รอดอยู่ และผองเพื่อนที่คอยให้คำปรึกษา-คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณน้องๆที่ห้อง 407 และ 448 พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย และทำให้มีช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาคจุลชีววิทยาแห่งนี้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญภาพ ..... ฎ
สารบัญตาราง ..... ต
บทที่ 1 บทนำ ..... 1
1.1 ประวัติความเป็นมา ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ ..... 3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ ..... 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 4
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ ..... 5
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) ..... 5
2.1.1 ความหมายและความสำคัญของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 7
2.1.2 องค์ประกอบของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 12
2.2 การจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 17
2.2.1 จำแนกตามหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 17
2.2.2 จำแนกตามชนิดของมอโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ ..... 18
2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (Microbial polysaccharides) ..... 24
2.4 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ ..... 32
2.4.1 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ..... 33
2.4.2 ด้านการบำบัดน้ำเสีย ..... 34
2.4.3 ผลิตภัณฑ์ทางการค้า (Commercial products) ..... 35
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 41
2.6 แหล่งอาหารที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 44
2.6.1 แหล่งคาร์บอน ..... 44
2.6.2 แหล่งไนโตรเจน ..... 45

หน้า

2.7 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 45
2.7.1 อุณหภูมิ ..... 45
2.7.2 ความเป็นกรดเบส ..... 46
2.7.3 การให้อากาศหรือการกวน ..... 47
2.8 การศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 50
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย ..... 52
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย ..... 52
3.2 เคมีภัณฑ์ ..... 54
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย ..... 56
3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ .. 56
3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ..... 57
3.3.3 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย ..... 57
3.3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง ..... 57
3.3.5 การศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง ..... 59
3.3.6 การศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร ..... 73
3.3.7 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 74
3.3.8 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 76
3.3.9 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 78
3.3.10 การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน ..... 78
3.3.11 การศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 78
3.3.12 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ... 79
3.3.13 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ ..... 80
บทที่ 4 ผลการทดลอง ..... 81
4.1 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 81

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงระดับขวดเขย่า ..... 83
4.3 การศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ..... 89
4.3.1 ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ..... 89
4.3.2 ผลทางชีวเคมี ..... 91
4.3.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ..... 94
4.4 รูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร ..... 97
4.5 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 98
4.5.1 การผันแปรแหล่งคาร์บอน ..... 98
4.5.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ..... 102
4.5.3 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ..... 104
4.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 108
4.6.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ..... 108
4.6.2 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม ..... 110
4.6.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม ..... 112
4.6.4 การเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ ..... 114
4.7 สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ..... 119
4.8 การหาส่วนประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 120
4.8.1 วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ..... 120
4.8.2 วัดโดยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ ..... 122
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง ..... 123
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง ..... 123
5.2 ข้อเสนอแนะ ..... 132
รายการอ้างอิง ..... 133
ภาคผนวก ..... 161

ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 162
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ..... 171
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน ..... 179
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ ..... 181
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ..... 183

# สารบัญภาพ

หน้า


รูปที่ 2.1 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ก) ไคตินที่พบในสัตว์จำพวกแมลง กุ้ง และปู ข) วุ้นที่พบในสาหร่าย ค) แซนแทนกัมที่พบในเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ..... 6

รูปที่ 2.2 ก) 6-deoxy-D-glucose หรือ quinovose (ข) 6-deoxy-L-mannose หรือ แรมโนส และ(ค) 6-deoxy-L-galactose หรือ ฟูโคส ..... 12

รูปที่ 2.3 โครงสร้างมอโนแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดในพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 13

รูปที่ 2.4 โครงสร้างแป้งในพืชที่ประกอบด้วยอะไมโลส [poly(1,4-α-D-glucose)] และอะไมโลเพคติน [1,6-branched amylose] ..... 17

รูปที่ 2.5 โครงสร้างเซลลูโลสในพืช ..... 18

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของพูลลูแลน ..... 19

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเดกซ์แทรน ..... 20

รูปที่ 2.8 โครงสร้างของลีแวน ..... 20

รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเคอร์ดแลน ..... 21

รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสเคลอโรกลูแคน ..... 21

รูปที่ 2.11 โครงสร้างของแซนแทน ..... 22

รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเจลแลน ..... 23

รูปที่ 2.13 โครงสร้างหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter amnigenus* ..... 24

รูปที่ 2.14 โครงสร้างของกรดไทโคอิกที่เป็นโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตโดย *Clostridium difficile* ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ ก) pentaglycosyl phosphate ข) hexaglycosyl phosphate ..... 25

รูปที่ 2.15 โครงสร้างของ O-specific polysaccharide (OPS) จากไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย ก) *Xanthomonas cassavae* สายพันธุ์ GSPB 2437 ข) *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ OX1 ..... 26

รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ O-specific polysaccharide ของไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตโดย *Pantoea agglomerans* สายพันธุ์ FL1 ..... 26

รูปที่ 2.17 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็น Capsular polysaccharide ที่ผลิตโดย *Salmonella enteritidis* A) โครงสร้างโดยรวม B) หน่วยโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีรูปเส้นตรง C) โครงสร้างเส้นตรงของหน่วยย่อย O-Ag ..... 27
รูปที่ 2.18 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็น Capsular polysaccharide *Rhizobium rubi* สายพันธุ์ DSM 30149 ..... 28
รูปที่ 2.19 แสดงปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 41
รูปที่ 2.20 แนวทางการศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 51
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีเมือกเยิ้ม และมีความหนืด คัดแยกที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก) 24 ชั่วโมง และ ข) บางสายพันธุ์เลี้ยงจนโคโลนีโตสุด ..... 81
รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบลักษณะอาหารก่อนเลี้ยงเชื้อและหลังการเลี้ยงเชื้อ (ลักษณะข้นหนืด) ..... 84
รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิต พอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง ..... 86
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) ..... 87
รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ..... 89
รูปที่ 4.6 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100×10) ..... 89
รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ขึ้นบนอาหาร ก) MacConkey Agar ข) Eosin Methylene Blue Agar (EMB) ..... 91
รูปที่ 4.8 phylogenetic tree บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ 16SrDNA ของ *Bacillus subtilis* เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับ ที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap ..... 96

รูปที่ 4.9 การเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ..... 97

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..... 98

รูปที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ..... 99

รูปที่ 4.12 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโทส โดยมี ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากัน ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง..... 100

รูปที่ 4.13 ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนของ ก) ซูโครส ข) กลูโคส และ ค) แลคโทส. 100

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)..... 101

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 ..... 102

รูปที่ 4.16 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ..... 103

รูปที่ 4.17 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ..... 104

รูปที่ 4.18 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วน ซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ..... 105

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 ..... 105

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 ..... 106

รูปที่ 4.21 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ..... 107

หน้า

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 ..... 107

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 ..... 108

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 109

รูปที่ 4.25 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ ระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส ..... 109

รูปที่ 4.26 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ ระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส ..... 110

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 ..... 111

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 ..... 111

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 ..... 112

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 ..... 113

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 ..... 113

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 ..... 114

รูปที่ 4.33 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย ..... 115

รูปที่ 4.34 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย ..... 115

รูปที่ 4.35 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย..... 116

รูปที่ 4.36 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ก่อนและหลังการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 119

รูปที่ 4.37 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02..... 120

รูปที่ 4.38 ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ที่เกิดขึ้นจากการหาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์..... 120

รูปที่ 4.39 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้น้ำกลั่นปลอดประจุ (DII) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ก) สารมาตรฐานน้ำตาลไซโลสและไรโบส ข) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ..... 121

รูปที่ 4.40 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด ..... 122

# สารบัญตาราง

หน้า


ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย 6-deoxysugars (6-d-s) ..... 8

ตารางที่ 2.2 Non-carbohydrate substituents ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียแกรมลบ ..... 16

ตารางที่ 2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (Anionic polysaccharides) ..... 30

ตารางที่ 2.4 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (Neutral polysaccharides) ..... 31

ตารางที่ 2.5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ..... 37

ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ทางอุตสาหกรรมของแซนแทน ..... 40

ตารางที่ 2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ..... 49

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 82

ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการวิเคราะห์โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ของแบคทีเรีย 24 สายพันธุ์ ..... 82

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์เฉลี่ย และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์เฉลี่ยของแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 24 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ ..... 84

ตารางที่ 4.4 ค่า $R_f$ (Retardation factor) ของสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ผลิตได้ และองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการวิเคราะห์โดย Thin Layer Chromatography (TLC) ..... 88

ตารางที่ 4.5 ผลการจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ..... 90

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบลักษณะทางทั่วไปและทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 กับเชื้อเทียบเคียง *Enterobacter cloacae* ..... 92

ตารางที่ 4.7 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกับแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ..... 94

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) ..... 95

ตารางที่ 4.9 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณโดยเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ไปที่ 40 องศาเซลเซียส ..... 117

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และเวลาในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ..... 117

หน้า

ตารางที่ 4.11 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% โดยปริมาตร ..... 118

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของสกุล *Enterobacter* สายพันธุ์ต่างๆ ..... 130