การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02

นางสาวพนิดา เทียมชัยบุตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FEASIBILITY STUDY OF EMPLOYING AGRICULTURAL WASTES FOR EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Enterobacter cloacae* EN02

Miss Panida Teamchaiboot

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

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02
โดย	นางสาวพนิดา เทียมชัยบุตร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พนิดา เทียมชัยบุตร : การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02. (FEASIBILITY STUDY OF EMPLOYING AGRICULTURAL WASTES FOR EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Enterobacter cloacae* EN02) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 119 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยมุ่งต่อการเลี้ยงจุลินทรีย์นี้ให้เจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงโดยอาศัยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ปัจจัยที่คำนึงถึง ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ตลอดจนทำการแปรผันพารามิเตอร์ทางกายภาพที่เกี่ยวข้องอันได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบส พบว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ซานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว แกลบ และกากน้ำตาล และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาใช้ศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงา ไม่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ได้ โดยหลังการพัฒนาสูตร พบว่าอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 3.0% และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 0.06% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 0.02% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งเกลือแร่ ภายใต้ภาวะที่ปรับค่าความเป็นค่ากรด-เบสเริ่มต้นที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงแรก และปรับเป็น 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา ทำให้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูงสุดที่ 4.86 กรัมต่อลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้สอดคล้องกับที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้าโดยพบว่าเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ (acidic heteropolysaccharide) ประกอบด้วยไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีกลูโคสและโปรตีนเพียงเล็กน้อย อุณหภูมิที่หลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 227.5 องศาเซลเซียส

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....พนิดา เทียมชัยบุตร.....

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

ปีการศึกษา..2551.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม...สุชาดา จันทร์ประทีป

4872572323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : POLYSACCHARIDE PRODUCTION / CARBON SOURCES / NITROGEN SOURCES / *Enterobacter cloacae* EN02 / OPTIMIZATION / MEDIUM

PANIDA TEAMCHAIBOOT : FEASIBILITY STUDY OF EMPLOYING AGRICULTURAL WASTES FOR EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Enterobacter cloacae* EN02. ADVISOR : ASSOC.PROF. SUTHEP THANEEYAWARN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D., 119 pp.

The present study encompassed the formulation of medium for growth and polysaccharide production by *Enterobacter cloacae* EN02 employing agriculture wastes as its ingredient. Parameters of concern were carbon and nitrogen sources, vitamin mineral, initial pH and temperature. We anticipated that agricultural wastes including bagass, rice straw, rice bran, paddy husk, molass as sources of carbon and soy bean meal, sun flower meal, sesame seed as nitrogen sources were not satisfactory for use in polysaccharide production by our organism. A formulated medium upon further study possesses ingredient of 3.0% (w/v) sucrose, 0.06% (w/v) ammonium chloride (NH_4Cl) as carbon and nitrogen sources, respectively with 0.02% (w/v) magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) as mineral source. The optimum environmental conditions were initial pH of 6.5 at 30°C for 6 hours for optimum growth then shift to 40°C for polysaccharide production. Under such condition *E. cloacae* EN02 was able to produce polysaccharide at 4.86 g/L in the culture medium. The obtained polysaccharide was characterized as an acidic heteropolysaccharide, composed predominantly xylose with minor amount of glucose and protein. Thermogravimetric analysis (TGA) under nitrogen atmosphere indicated its melting point of 227.5°C.

Department : .....Microbiology.....Student's Signature.....Panida Teamchaiboot.....

Field of Study : .....Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....Suthep Thaneeyawarn.....

Academic Year : ..2008.....Co-Advisor's Signature.....Suchada Chanprateep.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ การสนับสนุนและช่วยเหลือ ตลอดจนการสั่งสอนด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ อย่างดียิ่งเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณท่านรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความสะดวกในการใช้เครื่องมือสำหรับงานวิจัย และขอขอบคุณบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด และบริษัท ยูเนียนฟูด อินดัสตรี จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ บริษัท Genencor, Finland และบริษัท สยามวิคตอรี่ เคมิคอล จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเอนไซม์ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา เพื่อน ๆ พี่ณฤดี อัศวเสรีเลิศ ตลอดจนพี่ ๆ และน้อง ๆ ห้อง 448 และห้องวิจัยอื่น ที่คอยให้ความช่วยเหลือคำแนะนำและความรู้ด้านต่าง ๆ ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกประทับใจ และมีช่วงเวลาที่ดีตลอดการศึกษาและทำงานวิจัย ณ ภาคจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณมารดาและน้องสาวที่น่ารัก ญาติพี่น้อง เพื่อน ๆ มัธยมและเพื่อน ๆ ภาคชีวเคมี และน้อง ๆ ที่ได้รู้จักกัน ที่คอยดูแลเอาใจใส่ คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่ดี และคอยให้กำลังใจเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

2. ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์..... 3

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์..... 6

2.3 ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์..... 13

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์..... 18

2.5 ส่วนประกอบในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร..... 31

2.6 การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร..... 35

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 42

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 44

3.3 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย..... 45

3.4 เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 45

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 46

3.5.2 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน.. 47

บทที่ หน้า

3.5.3 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์..... 49
3.5.4 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 50
3.5.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลง..... 53
3.5.6 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลง..... 54
3.5.7 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ระหว่างสูตรอาหารเดิมและสูตรอาหารที่ดัดแปลงใหม่..... 54
3.5.8 การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่..... 55
3.5.9 ศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้..... 56
4. ผลการทดลอง
4.1 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน..... 58
4.2 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์... 65
4.3 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *E cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 66
4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่..... 74
4.5 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่..... 77
4.6 การเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ระหว่างสูตรอาหารเดิมและสูตรอาหารที่ดัดแปลงใหม่..... 78
4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่..... 81
4.8 สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02..... 84

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 89
รายการอ้างอิง..... 97
ภาคผนวก..... 110
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 111
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์และเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 112
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 119

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ตัวอย่างจุลินทรีย์และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้.....	8
2.2	ตัวอย่างชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์.....	10
2.3	ตัวอย่างหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม.....	13
2.4	ประโยชน์ของแซนแทนกัมในอุตสาหกรรมต่าง ๆ.....	16
2.5	พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิต.....	19
2.6	ตัวอย่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม.....	30
2.7	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียระหว่างการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดและด้วยเอนไซม์.....	41
4.1	แอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสและบีต้ากลูโคซิเดสของเซลลูเลส GC220.....	58
4.2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเสตของชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบจากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 ด้วยเวลาที่เหมาะสมของวัสดุเหลือใช้แต่ละชนิด.....	63
4.3	เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเสตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรระหว่างการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกและเซลลูเลส GC220.....	64
4.4	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์EN02 อัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณสารตั้งต้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	66
4.5	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ	68
4.6	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน.....	69

ตาราง หน้า

4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน..... 70

4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งวิตามินและเกลือแร่..... 71

4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 79

4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.3)..... 79

4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 82

4.12 สรุปสูตรอาหารดัดแปลงใหม่และภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์..... 83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของสเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) และเคอร์ดแลน (curdlan).....	4
2.2	ลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส.....	32
2.3	เซลลูโลสในเซลล์พืช.....	32
2.4	ตัวอย่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส.....	34
2.5	ตัวอย่างองค์ประกอบของลิกนิน.....	35
2.6	การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสิก.....	38
4.1	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อย ด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ.....	59
4.2	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส GC220 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสในช่วง 4.0 – 8.0.....	60
4.3	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อย ด้วยเซลลูเลส GC220 โดยแปรผันปริมาณเซลลูเลส GC220 ตั้งแต่ 0 – 50 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส).....	61
4.4	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเซลลูเลส GC220 5 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อยตั้งแต่ 1 3 6 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง.....	62
4.5	ปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดโดยวิธี Kjeldahl.....	65
4.6	ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์EN02.....	67
4.7	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นซูโครส 1.0 – 5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	72
4.8	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.02 - 0.12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	73

รูปที่ หน้า

4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.3 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5.5 – 7.5..... 75

4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.3 โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 30 – 45 องศาเซลเซียส..... 76

4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 77

4.12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) และอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.3)..... 80

4.13 เปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) และอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.3) 80

4.14 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (ไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 85% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที..... 85

4.15 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 85% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที..... 86

4.16 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้น้ำกลั่นปลอดประจุเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที..... 87

4.17 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่หลอมเหลวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. Cloacae*..... 88

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นสารกลุ่มหนึ่งของคาร์โบไฮเดรตที่ในโมเลกุลประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไปจนถึงเป็นจำนวนร้อยหรือพันโมเลกุล พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสารประกอบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous) ไม่มีสีและส่วนใหญ่ไม่มีรสชาติ เมื่อละลายน้ำจะได้คอลลอยด์และสกัดแยกออกมาทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก

เนื่องจากสมบัติทางด้านเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมปิโตรเลียม ด้านการแพทย์ และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น (Vandamme และคณะ, 2002) โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีทั้งที่ผลิตจากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ขึ้น

พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติ สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ตัวอย่างของพอลิแซ็กคาไรด์จากพืช ได้แก่ กัวร์กัม (guar gum) โลคัสต์บีนกัม (locust bean gum) และทรากาแคนท์กัม (tragacanth gum) เป็นต้น ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสัตว์ ได้แก่ ไคติน (chitin) (Whistler และ BeMiller, 1993) และตัวอย่างของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ ได้แก่ แซนแทนกัม (xanthan gum) และเดกซ์แทรน (dextran) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยควบคุมภาวะที่ใช้ในการหมัก (fermentation) และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เป็นจำนวนมาก ในขณะที่การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืช มีข้อจำกัด คือ พืชหนึ่งชนิด มักจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดพร้อมกัน จึงต้องมีขั้นตอนการแยกพอลิแซ็กคาไรด์เฉพาะที่ต้องการออก ทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้น (Whistler, 1993) และการปลูกพืชยังขึ้นกับสภาพดินฟ้าอากาศและฤดูกาล (Rehm and Reed, 1993)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ คือ ชนิดของจุลินทรีย์ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิตามินและแร่ธาตุ อุณหภูมิที่บ่ม ค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น โดยการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ในปริมาณมาก ๆ นั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงความคุ้มทุน อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญ

ประการหนึ่งสำหรับค่าใช้จ่ายในการผลิต ทั้งนี้สูตรอาหารที่จะใช้ในอุตสาหกรรมควรมีราคาถูกและให้การเจริญตลอดจนการผลิตสารที่ต้องการได้ดี ปกติแล้วการเข้าสู่สูตรอาหาร ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงอย่างมาก คือ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาจเตรียมได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural wastes) ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนยังอาจเป็นชนิดอินทรีย์ อนินทรีย์ หรือร่วมกัน โดยไนโตรเจนอินทรีย์ก็สามารถเตรียมได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือแหล่งที่มีราคาถูกอื่น ๆ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก และวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1. เตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน
2. เตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์
3. หาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์
4. หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลง
5. ศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลง
6. หาองค์ประกอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้ทำให้ทราบสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณมาก แต่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียในระดับขยายส่วนต่อไป

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

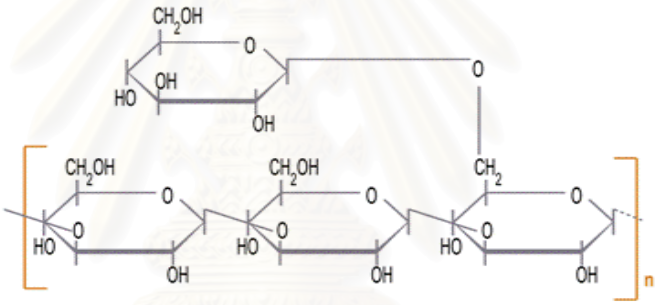
พอลิแซ็กคาไรด์เป็นกลุ่มหนึ่งของสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ในโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไป จนถึงเป็นจำนวนร้อยหรือพันโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Paul, 1979) พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โครงแบบและตำแหน่งของพันธะไกลโคซิดิกและลักษณะของสายพอลิเมอร์ที่เป็นสายตรง (linear) หรือมีแขนง (branch) โครงสร้างที่แตกต่างกันนี้ จะมีผลทำให้พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีหน้าที่ทางชีวภาพแตกต่างกัน (Lehninger, 1993) พอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีหน้าที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (structural polysaccharide) ของเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ ทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่เซลล์ ตัวอย่างเช่น เพกทิน (pectin) เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช ไคตินเป็นองค์ประกอบในเปลือกของสัตว์น้ำ เช่น กุ้งและปู ส่วนกรดมิวรามิก (muramic acid) เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย พอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดเป็นแหล่งสะสมอาหาร (storage polysaccharide) เช่น แป้ง (starch) เป็นแหล่งสะสมอาหารของพืช และไกลโคเจน (glycogen) เป็นแหล่งสะสมอาหารของสัตว์ เมื่อต้องการจะนำไปใช้ในยามขาดแคลนไกลโคเจนจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลายเป็นกลูโคส แล้วจึงนำไปใช้ต่อไป (Lehninger, 1975; BeMiller and Whistler, 1996)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสารประกอบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่มีสีและส่วนใหญ่ไม่มีรสชาติ สามารถดูดน้ำได้ดี เมื่อละลายน้ำจะได้คอลลอยด์และสกัดแยกออกมาทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก (Gaman and Sherrington, 1990)

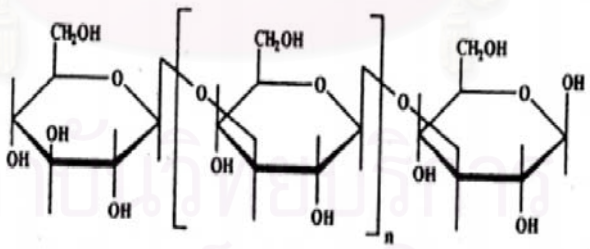
พอลิแซ็กคาไรด์ จำแนกออกตามลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลได้เป็น 3 กลุ่ม (Margaritis and Pace, 1985; DeMan, 1990) คือ

1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharides) คือ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส

พูลลูแลน (pullulan) และเดกซ์แทรน เป็นต้น โดยการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้สันนิษฐานว่า ถูกสร้างมาจากการทำงานและการควบคุมของเอนไซม์ที่มีระบบไม่ซับซ้อน นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังเรียกชื่อตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ได้แก่ เพนโทแซน (pentosans) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส เช่น ไซแลน เป็นพอลิเมอร์ของไซโลส และอะราแบน (araban) เป็นพอลิเมอร์ของอะราบิโนส อย่างไรก็ตาม มีพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวเหมือนกัน โดยในทางการค้าเรียกว่ากลูแคน ได้แก่ เดกซ์แทรน พูลลูแลน สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) และเคอร์ดแลน (curdlan) เป็นต้น โดยพบว่า ถึงแม้ว่าในโครงสร้างจะมี β (1 $\rightarrow$ 3) เช่นเดียวกัน แต่สมบัติต่างกัน เนื่องจากลักษณะสายพอลิเมอร์ของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น สเคลอโรกลูแคนมีลักษณะเป็น regular branch ในขณะที่เคอร์ดแลนเป็น unbranched polymer (จันทร์จนา ตันสกุล, 2539) ดังรูปที่ 2.1



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ ก) สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) และ ข) เคอร์ดแลน (curdlan) (http://www.cargilltexturizing.com)

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharides) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 หรือมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป เช่น เพกทิน กัม (gum) เฮมิเซลลูโลส เรซิน และแซนแทน เป็นต้น โดยการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้สันนิษฐานว่าถูกสร้างขึ้นมาจากการทำงานและการควบคุมของเอนไซม์ที่มีระบบซับซ้อน

3. สารประกอบคอนจูเกต (conjugated compounds) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่เกาะรวมอยู่กับสารอื่น เช่น รวมกับลิพิดเป็นไกลโคลิพิด หรือรวมกับโปรตีนเป็นไกลโคโปรตีน ในสัตว์จะพบไกลโคโปรตีนอยู่ที่ผิวเซลล์ และที่ของเหลวต่าง ๆ ในร่างกาย พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอยู่ในไกลโคโปรตีนมีปริมาณแตกต่างกัน ระหว่าง 1% ถึง 80% ของน้ำหนัก (Stryer, 1995)

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ ออกตามลักษณะประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 3 ชนิด (Margaritis and Pace, 1985) คือ

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharides) ได้แก่ เลแวน พูลลูแลน เดกซ์แทรน สเคลอโรกลูแคน เซลลูโลส และเคอร์ดแลน เป็นต้น

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic polysaccharides) หรือบางครั้ง เรียกว่า acidic เช่น แซนแทน ที่มีหมู่อะเซทิลกับไพรูเวต (Pyruvate) อยู่บนโมเลกุล โดยระดับของ pyruvalation มีผลต่อสมบัติทางกายภาพของแซนแทน

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นบวก (cationic polysaccharides) ได้แก่ พวกที่มีหมู่ NH_2 หรือมีหมู่ของกรดอะมิโนบางตัวต่ออยู่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 **พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์** (microbial polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์เริ่มมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีสมบัติเฉพาะตัวที่ดีกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากพืช เช่น แซนแทนกัม มีสมบัติด้านความหนืด ความเสถียร ในแง่ความเป็นกรด-เบสที่กว้าง และมีความทนต่ออุณหภูมิสูง (thermotolerance) อีกประการที่สำคัญ คือ ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้ โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูกาลหรือมลพิษทางทะเล ในขณะที่เราต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้เมื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย (Rehm and Reed, 1993)

การศึกษาเกี่ยวกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ในสมัยก่อนจะศึกษาในแง่ของการเป็นแอนติเจน และการก่อโรค (Cerning, 1990) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะให้การสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป สามารถจำแนกได้เป็น 3 แบบ (Paul, 1979) คือ

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะสร้างอยู่ภายในเซลล์ บางส่วนจะรวมเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) และทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารจำพวกคาร์บอนหรือแหล่งสะสมพลังงานของเซลล์

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง (structural polysaccharide) เป็นองค์ประกอบที่แทรกอยู่ในผนังเซลล์และในบางกรณีอาจรวมตัวกับส่วนประกอบอื่น เช่น รวมกับลิพิดเป็นไกลโคลิพิด และรวมกับพอลิเพปไทด์เป็นเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีสารเพปติโดไกลแคนเป็นองค์ประกอบสำคัญ ใน *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียที่พบในน้ำหนองของฝีหรือแผลติดเชื้อ จะมีสายพอลิเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนห้าหมู่ (peptapeptide) เป็นไกลซีนอย่างเดียว โครงสร้างของเพปติโดไกลแคนในผนังเซลล์ของแบคทีเรียนี้ เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า มิวรีน (murein) (Dumitrice, 1996) เมื่อนำแบคทีเรียแกรมบวก มาย้อมสีแกรม (Gram's stain) ชั้นของเพปติโดไกลแคนที่ซ้อนกันเป็นชั้น ๆ ล้อมรอบเซลล์จะติดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* ชั้นของเพปทิโดไกลแคนจะถูกคลุมด้วยไขมันและโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic protein) ทำให้ย้อมสีแกรมไม่ติด

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide : EPS) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้สร้างขึ้นเพื่อเป็นโครงสร้างที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า แคปซูล (capsule) มีลักษณะเป็นสารเหนียวคล้ายเจลเคลือบหรือปกคลุมเซลล์ มักทำให้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นเมือกเยิ้ม (mucoid) หรือเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะขึ้นมาจะยืดเป็นเส้นสาย แคปซูลไม่ได้มีในแบคทีเรียทุกชนิด ขนาดของแคปซูลจะใหญ่หรือเล็กขึ้นกับอาหารและสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงในอาหารนั้น ๆ องค์ประกอบทางเคมีของแคปซูล แตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย อาจเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์คอมเพล็กซ์ (polysaccharide complex) ล้วน ๆ หรือมีองค์ประกอบร่วมกับสารอื่น สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์มีหลายชนิด เช่น เดกซ์แทรน เดกซ์ทริน เลแวน เซลลูโลส มีสารที่คล้ายแคปซูลอีกชนิดหนึ่ง คือ เมือก (slime) มีองค์ประกอบและโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยกว่าแคปซูล แต่ละลายในอาหารได้ดีกว่า องค์ประกอบเป็นพวกพอลิแซ็กคาไรด์และพอลิเพปไทด์ ชั้นของแคปซูลและเมือกอาจไม่จำเป็นต่อเซลล์มากนัก พบว่าอาจสลัดออกจากเซลล์ได้และเซลล์จะสร้างใหม่อีก ปริมาณของแคปซูลขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม อาจจะสร้างได้ปริมาณมากถ้าเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาล (Robert, 1996)

ตัวอย่างเชื้อสร้างเดกซ์แทรน (พอลิเมอร์ของกลูโคส) เช่น *Leuconostoc* sp. (James และ Cameron,1971; Geronimos และ Greenfiold,1978), *Streptococcus* sp. บางชนิด ได้แก่ *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sorbinus* และ *S. downei* เป็นต้น (Tsumuraraya และ Misaki, 1979) และ *Acetobacter* sp. บางชนิด ได้แก่ *Acetobacter capsulatus* หรือ *Gluconobacter oxydans* และ *Acetobacter viscus* เป็นต้น (Sim และคณะ, 2001) ส่วนเชื้อที่สร้างเลแวน (พอลิเมอร์ของฟรักโทส) เช่น *Streptococcus salivarius* (Whiley และ Beighton, 1998)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Paul, 1979; Margaritis and Pace, 1985; Sutherland, 1996; Ganesh Kumar และคณะ, 2004) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์โดยมากเป็นพวกที่ละลายน้ำได้และเป็นสารที่ถูกขับออกมานอกเซลล์จุลินทรีย์ (EPS) (Yalpani และ Sandford, 1987) และจากการจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ตามลักษณะประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์นั้น Pace และ Righelato (1991) รายงานว่า การสร้าง EPS ของจุลินทรีย์สามารถแยกได้ตามลักษณะกลุ่มของพอลิเมอร์ว่าเป็นแบบพอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polymer) และพอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นลบ (anionic polymer) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ยังมีความสามารถในการเชื่อมต่อโมเลกุลน้ำตาลที่แตกต่างกันถึง 7 ชนิด รวมไปถึงการเชื่อมกับสารประกอบที่ไม่ใช่น้ำตาล เช่น glycoaminoglycans (Crezenzi, 1995)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ (Sutherland, 1996)

จุลินทรีย์	พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้
Xanthomonas campestris	แซนแทน (xanthan)
Pseudomonas elodea	เจลแลน (gellan)
Leuconostoc mesenteroides	เดกซ์แทรน (dextran)
Alcaligenes sp.	เวแลน (welan) และแรมแซน (rhamsan)
Alcaligenes faecalis var. *myxogenes*	ซักซิโนไกลแคน (succinoglycan)
Aureobasidium pullulans	พูลลูแลน (pullulans)
Sclerotium rolfsii	สเครอโรกลูแคน (scleroglucan)
Sphingomonas paucimobilis	เจลแลน (gellan)
Streptococcus equii	กรดไฮยาลูโลนิก (hyaluronic acid)
Rhizobium	ซักซิโนไกลแคน (succinoglycan)
Acetobacter xylinium	เซลลูโลส (cellulose)
Azotobacter chrococcum	แอลจิเนต (alginate)

Germine และคณะ (1974) รายงานว่า องค์ประกอบของเดกซ์แทรนหลังจากผ่านการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก ประกอบด้วย กลูโคส ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทไทรโอส (isomaltotriose) ไอโซมอลโทเพนทะโอส (isomaltopentaose) และไอโซมอลโทเฮกซะโอส (isomaltohexaose)

Fukui และคณะ (1982) รายงานว่า องค์ประกอบของเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำจาก *S. mutans* 6715 หลังจากผ่านการย่อยสลายด้วยกรดฟอร์มิก ประกอบด้วย ไอโซมอลโทส และไนจีโรส (nigerose)

Ramaskaya และ Dyment (1982) รายงานว่า พอลิเมอร์ที่ขับออกมานอกเซลล์ที่มีลักษณะข้นหนืดของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและ

คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate-protein complexs) โดยมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส กาแลกโทส และแรมโนส

Oda และคณะ (1983) รายงานว่า องค์ประกอบของ EPS ที่ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* var. *joghurti* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และกาแลกโทส ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีสมบัติเป็นสารต้านเนื้องอก (antitumor)

Marcura และ Townsley (1984) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกจากภาชนะบรรจุแบบไร้อากาศประกอบด้วยไกลโคโปรตีน โดยโปรตีนเชื่อมกับน้ำตาลเฮกโซส และส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น เมทิลเพนโทส นอกจากนี้ยังพบว่า *Pediococcus* sp. ในอุตสาหกรรมเบียร์และไวน์ มีการสร้าง EPS เป็นบีตากลูแคน (β-glucan) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยพันธะ β - 1,3 และ β - 1,2

Cerning และคณะ (1986) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Lactobacillus bulgaricus* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กาแลกโทส กลูโคส และแรมโนส ในอัตราส่วน 4:1:1

Cerning และคณะ (1990) รายงานว่า EPS ส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และกาแลกโทส ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Streptococcus thermophilus* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กาแลกโทส กลูโคส และไซโลส มีอะราบิโนส แมนโนส (mannose) และแรมโนส เพียงเล็กน้อย โดยความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อจะลดลง เมื่อมีการถ่ายเชื้อบ่อยครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Cerning และคณะ, 1990)

จุลินทรีย์	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวใน EPS							
	Gal	Glu	Fru	Rha	Man	Xyl	Ara	Neu
Lb. delbrueckii	+	+	-	-	+	-	+	-
sp. *bulgaricus*	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-	-
S. salivarius	+	+	-	tr	+	tr	tr	-
sp. *thermophilus*	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	+	-	+
	+	+	-	tr	tr	-	tr	-
Lc. lactis	+	+	-	+	-	-	-	-
sp. *cremoris*	+	+	-	-	-	-	-	-

Gal = Galactose Glu = Glucose Fru = Fructose Rha = Rhamnose
Xyl = Xylose Ara = Arabinose Neu = Neuramic acid tr = Traces

Kojic และคณะ (1992) รายงานว่า *Lactobacillus casei* CG11 ที่แยกจากเนยแข็งสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีลักษณะประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส และแรมโนส ในอัตราส่วน 75% และ 25% ตามลำดับ

Manca de Nadra และ Strasser de Saad (1995) รายงานว่า *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จากไวน์ประเทศอาร์เจนตินา สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส ฟรักโทส และกาแลกโทส ที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 และ α-1,6 ไกลโคซิดิก ในอัตราส่วน 1:1 และประกอบด้วยน้ำตาลเฮกโซส 5,500 โมเลกุล

Antti และคณะ (1999) รายงานว่า มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์พร้อมทั้งมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) ทำให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และได้ศึกษาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่จุลินทรีย์ดังกล่าวผลิตขึ้น พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบมากที่สุด คือ กลูโคส

Ganesh Kumar และคณะ (2004) รายงานว่า *Bacillus* sp. I-450 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนมลพิษสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีประจุเป็นกลาง (neutral sugars) คือ กาแลกโทส ฟรักโทส กลูโคส และแรฟฟิโนส น้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน (amino sugars) และกรดยูโรนิก (uronic acids) ในอัตราส่วน 52.4 % 2.4 % และ17.2 % ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุล 2.2 X 10^6 ดาลตัน

Forabosco และคณะ (2006) รายงานว่า พูลลูแลนที่ผลิตโดย *Cryphonectria parasitica* สายพันธุ์ CP159 CP263 และCP102 ประกอบด้วยหน่วยย่อย α - (1$\rightarrow$6) มอลโทเททระโอส (maltotetraose) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่า โครงสร้างของพูลลูแลนมีผลต่อการก่อเกิดโรคและระดับความรุนแรงของอาการในพืชที่ได้รับเชื้อจาก *Cryphonectria parasitica*

Parikh และ Madamwar (2006) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดยไซแอโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cyanothece* sp. *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp. และ *Nostoc carneum* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 4 ชนิด คือ แมนโนส กลูโคส ไซโลส และไรโบส ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน และพบว่า EPS ที่ผลิตโดย *Cyanothece* sp. มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ

Prasertsan และคณะ (2006) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* WD7 เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วย น้ำตาลที่มีประจุเป็นกลาง (neutral sugars) 29.4 % กรดยูโรนิก (uronic acids) 14.2 % และน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน (amino sugars) 0.93 %

Mata และคณะ (2006) รายงานว่า แบคทีเรียที่ชอบเค็ม (halophilic bacteria) 2 สปีชีส์ คือ *Halomonas ventosae* และ *Halomonas anticariensis* สามารถผลิต EPS ได้ โดย *H. ventosae* สายพันธุ์ A112^{T} และ A116 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส แมนโนส และกาแลกโทส พอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ดาลตัน ส่วน *H. anticariensis* สายพันธุ์ FP35^{T} และ FP36 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส แมนโนส และ กรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) พอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุล 20,000 และ 46,000 ดาลตัน ตามลำดับ

Jia และคณะ (2007) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Nostoc flagelliforme* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีประจุเป็นกลาง 4 ชนิด คือ กลูโคส (43.2%) ไซโลส (20.6%) กาแลกโทส (29.9%) และแมนโนส (6.3%) มีน้ำหนักโมเลกุล 2.79 X 10^{5} ดาลตัน และพบว่า EPS ที่ผลิตได้ไม่มีหมู่ซัลเฟต กรดนิวคลีอิก และโปรตีนเป็นองค์ประกอบ

Mata และคณะ (2007) รายงานว่า แบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง (moderately halophilic bacteria) ที่จัดอยู่ในวงศ์ Alteromonadaceae 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Idiomarina fontislapidosi* F32^{T} *Idiomarina ramblicola* R22^{T} และ *Alteromonas hispanica* F23^{T} สามารถผลิต EPS ได้ โดย *Idiomarina* sp. ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และกาแลกโทส ส่วน *A. hispanica* F23^{T} ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และไซโลส

Sanchez-Medina และคณะ (2007) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* LBB.B26 ในนมที่สกัดเอาไขมันออก เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นกลาง ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และกาแลกโทส ในอัตราส่วน 2 : 3

2.3 ประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น เนื่องจากความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ผลิต และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะมีสมบัติทางด้านเคมีและกายภาพแตกต่างกัน จึงทำให้สามารถนำไปใช้งานได้หลายรูปแบบ เช่น สารให้ความหนืด สารก่อเจล สารให้ความคงตัว สารหล่อลื่น สารก่อการจับกลุ่ม และสารก่อฟิล์ม เป็นต้น (Margaritis and Pace, 1985; Sutherland, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 2 .6

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม (Monica, 2003)

พอลิแซ็กคาไรด์	จุลินทรีย์ที่ผลิต	การนำไปใช้
แซนแทน	*Xanthomonas campestris*	สารให้ความหนืด สารให้ความคงตัว และสารแขวนลอย
เดกซ์แทรน	*Leuconostoc mesenteroides, Klebsiella* sp.	สารก่อเจล สารให้ความคงตัว และสารหล่อลื่น
อะซีแทน	*Acetobacter xylinum*	สารให้ความหนืด และสารก่อเจล
เจลแลน	*Sphingomonas sp.*	สารก่อเจล สารให้ความคงตัว และสารแขวนลอย
แอลจิเนต	*Azotobacter vinelandii*	สารก่อเจล

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) ตัวอย่างหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม (Monica, 2003)

พอลิแซ็กคาไรด์	จุลินทรีย์ที่ผลิต	การนำไปใช้
พูลลูแลน	*Aureobasidium pullulans*	ไฟเบอร์ และสารยึดเกาะ
สเคอโรกลูแคน	*Sclerotium glucanicum*	สารปกคลุม
พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก lactic acid bacteria	*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus ssp, Lactococcus lactis*	สารให้ความหนืด และสารรักษาความชื้น

ตัวอย่างชนิดและประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ได้แก่

2.3.1 เซลลูโลส

ได้มีการนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. การนำเซลลูโลสที่ผลิตจาก *Acetobacter xylinum* ไปผสมกับพอลิเมอร์อื่น ๆ เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรง และทนทาน ใช้เป็นสารให้ความหนืด และความคงตัว ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง (Coffey และ Bell, 1995)

2. การนำเซลลูโลสที่ผลิตจาก *Acetobacter xylinum* ที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผง ไปผสมกับฟีนอลเรซิน (phenol resin) หรือเส้นใยคาร์บอน (carbon fiber) ที่ปกติไม่สามารถทำเป็นแผ่นได้ จะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ (Ross และคณะ, 1991)

3. ในการผลิตกระดาษ activated carbon fiber sheet เพื่อใช้ดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* ลงไป จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษให้ดีขึ้น (Ross และคณะ, 1991)

4. ในทางการแพทย์ ได้มีการนำเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียไปใช้ในการผลิตผิวหนังเทียม (artificial skin) และหลอดเลือดเทียม (artificial arteries) (Brown, 2002)

2.3.2 เดกซ์แทรน

ได้มีการนำเดกซ์แทรนและอนุพันธ์ของเดกซ์แทรนมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม ดังนี้

1. ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้มีการนำเดกซ์แทรนไปใช้เป็นสารปรุงแต่ง เช่น ในไอศกรีม เบเกอรี่ แยม และลูกกวาด วัตถุประสงค์หลักเพื่อช่วยให้เกิดความคงตัวและช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเนื้อสัมผัสดีขึ้น (Sutherland, 1996)

2. ด้านการแพทย์ ได้มีการนำเดกซ์แทรนไปใช้เพิ่มปริมาตรของโลหิต (blood plasma extender) ในผู้ป่วย (Ul Qader และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการนำอนุพันธ์ของเดกซ์แทรนมาใช้เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) และใช้รักษาบาดแผล (Sutherland, 1996)

3. ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ได้มีการนำเดกซ์แทรนมาผสมลงในผลิตภัณฑ์ครีมทาผิว และยาขี้ผึ้งต่าง ๆ โดยเดกซ์แทรนจะทำหน้าที่รักษาความชื้นได้เป็นอย่างดี (de Belder, 2003)

4. ในอุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน ได้มีการนำเดกซ์แทรนมาใช้เป็นสารหล่อลื่นบริเวณหัวเจาะน้ำมัน และด้วยสมบัติของเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เก็บน้ำมันโดยใช้หลักในการแทนที่ ทำให้น้ำมันลอยตัวขึ้นมาส่วนบนจึงสามารถเก็บน้ำมันสะดวกขึ้น (Kim และคณะ, 2000)

2.3.3 แซนแทนกัม

ในบรรดาพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย แซนแทนกัมเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากให้ความข้นหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ และมีความคงทนต่อความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิ นอกจากนี้แซนแทนกัมยังสามารถเกิดเจลได้ เมื่อนำไปผสมกับกาแลกโทแมนแนน (galactomannan) (Doublier and Llamas, 1991) ดังนั้นจึงมีการนำแซนแทนกัม ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.4 ประโยชน์ของแซนแทนกัมในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Margaritis and Pace, 1985)

Food Industry	Chemical Industry	Oil Industry
Dressings (high oil, no oil); Relishes and sauces; Syrups and toppings; Starch based product ; Dry mix products Farinaceous foods (Cakes); Beverages; Dairy product (ice cream); Confectionery.	Flowable pesticides; Liquid feed supplements; Cleaners, abrasives, and polishes; Metal working; Ceramic, Foundry coating; Texturized coatings; Slurry explosives; Dye and pigment suspensions.	Drilling fluids (muds); Workover and completion fluids; Enhanced oil recovery (polymer flooding).

Tekada และคณะ (1994) รายงานว่า จากการคัดแยกเชื้อจากใบไม้พบ *Enterobater* sp. ที่สามารถผลิต EPS ได้ และเมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและตรวจสอบสมบัติ พบว่ามีสมบัติทางด้านการไหล (rheology) และการเกิดเจล (gelling) คล้ายแซนแทนกัม

Yun และ Park (2003) รายงานว่า จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของ EPS ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. CP912 พบว่ามีความสามารถในการก่ออิมัลชันระหว่างน้ำมันกับน้ำ (emulsifying activity) และความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculating activity) ต่อแอคติเวตคาร์บอน (activated carbon) สูง

Arias และคณะ (2003) รายงานว่า มัวแรน (mauran) ที่ผลิตโดย *Halomonas maura* S30 เป็น EPS ที่มีความหนืดสูงและมีลักษณะเป็น pseudoplastic viscoelastic และ thixotropic โดยความหนืดของสารละลายมัวแรน มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรด-เบสที่กว้าง (3 - 11) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสามารถในการจับกับโลหะตะกั่ว และแคตไอออน (cations) อื่น ๆ สูง

Mata และคณะ (2006) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Halomonas ventosae* สายพันธุ์ A112^{T} และ A116 และ *Halomonas anticariensis* สายพันธุ์ FP35^{T} และ FP36 พบว่าสารละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีความหนืดต่ำ มีลักษณะเป็น pseudoplastic และมีความสามารถในการจับโลหะแคตไอออนสูง นอกจากนี้ยังสามารถเกิดไบโอฟิล์ม (biofilms) ทั้งในพอลิสไตรีน (polystyrene) และบอรอซิลิเกต (borosilicate)

Prasetsan และคณะ (2006) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Enterobacter cloacae* WD7 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ และจากการศึกษาสมบัติการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม พบว่าสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 4 - 60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส 5 - 7 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Mata และคณะ (2007) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Idiomarina fontislapidosi* F32^{T} *Idiomarina ramblicola* R22^{T} และ *Alteromonas hispanica* F23^{T} พบว่าสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ของทั้ง 3 สปีชีส์ มีความหนืดต่ำและมีลักษณะเป็น pseudoplastic นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสามารถในการก่ออิมัลชัน และความสามารถในการจับกับโลหะบางชนิด

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์

การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ชนิดของจุลินทรีย์และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิตามินและแร่ธาตุ อุณหภูมิที่บ่ม ค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น

2.4.1 ชนิดของจุลินทรีย์

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ มีหลักเกณฑ์ดังนี้ คือ เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงในระยะเวลาสั้น ยีนที่ควบคุมการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีความเสถียรหรือให้ผลผลิตสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนราคาถูก ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้ดี และให้ผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณต่ำ (Asai, 1968)

Toyosaki และคณะ (1995) รายงานว่า จากการคัดแยก *Acetobacter* sp. ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสจากผลไม้ ดอกไม้ และจากดิน พบว่า *Acetobacter* sp. BPR 2001 ที่คัดแยกได้จากผลไม้มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้ดีที่สุด

2.4.2 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ โดยเป็นแหล่งพลังงานแก่จุลินทรีย์ และองค์ประกอบหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรักโทส กาแลกโทส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น แลกโทส มอลโทส และซูโครส น้ำตาลเชิงซ้อน เช่น แป้ง และแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เป็นต้น (Masaoka และคณะ, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิต

ผลิตภัณฑ์	สารตั้งต้น	จุลินทรีย์ที่ผลิต	Yield	แหล่งอ้างอิง
แอลจิเนต	ซูโครส	*Azotobacter vinelandii* NCIB 9068	5% 25%	Bucke *et al*., 1975 Deavin *et al*., 1977
พอลิเมอร์ของ ดี-กลูโคส ดี-แมนโนส 6-ดีออกซี-แอล-แมนโนส และดี-ไรโบส	2% กลูโคส	*Xanthomonas fuscans*	35%	Konicek *et al*., 1977
เคอร์ดแลน ซักซิโนไกลแคน	กลูโคส	*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3	n.a.*	Amemura *et al*., 1977
เคอร์ดแลน	กลูโคส	*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 LFO 13140	50%	Harada *et al*., 1977
พอลิเมอร์ประกอบด้วย ดี-กลูโคส 81.9% แอล-แรมโนส 14% แอล-กลูโคส 0.7% ดี-แมนโนส 1.9% ดี-กาแลกโทส 1.5%	1.0 % เมทานอล	*Methylocytis parvus* OBBP	62%	Hou *et al*., 1978

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 **(ต่อ)** พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิต

ผลิตภัณฑ์	สารตั้งต้น	จุลินทรีย์ที่ผลิต	Yield	แหล่งอ้างอิง
พอลิแซ็กคาไรด์	4.55% เมทานอล	*Methylomonas mucose* NRRL B-5696	45.2%	Tam and Finn, 1977
พอลิแซ็กคาไรด์	0.3% เมทานอล	*Methylomonas methanolica* M13V mutant	n.a.*	Haggstrom, 1977
พอลิเมอร์ของ กาแลกโทส กลูโคส กรดกลูคูโรนิก และ แมนโนส	1% เมทานอล	*Pseudomonas viscogena* TS-1004	n.a.*	Misaki *et al.*, 1979
พอลิเมอร์ของ กลูโคส กาแลกโทส แรมโนส แมนโนส และอะเซทิลไพรูเวต	2% กลูโคส	*Pseudomonas* NCIB 11264	n.a.*	William and Wimpenny, 1978
เลแวน	2% ซูโครส	*Zygomonas mobilis* NCIB 8938	< 2%	Dawes *et al.*, 1966
สเคอโรกลูแคน	3% กลูโคส	*Sclerotium rolfsii* ATCC 15026	1.5 - 2.2%	Griffith and Compere, 1978
สเคอโรกลูแคน	5% แป้ง	*Sclerotium delphinii,* *Sclerotium glucanicum*	1.4% 1.8%	Griffith and Compere, 1978

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิต

ผลิตภัณฑ์	สารตั้งต้น	จุลินทรีย์ที่ผลิต	Yield	แหล่งอ้างอิง
PS-7 gum กลูโคส 73% แรมโนส 16% กรดกลูคูโรนิก 11%	3% กลูโคส	*Beijerinckia indica* var. *mysogenes*	n.a.*	Cottrell, 1980; Kang and McNeely, 1977
พูลลูแลน	5% กลูโคส	*Aureobasidium pullulans* S-1	50-60%	Ono *et al.*, 1977
ฟอสโฟแมนแนน	4.4% น้ำตาล	*Hansenula holstii* NRRL y-2448	20%	Stauffer and Leeder, 1978
เลแวน	6% แลกโทส	*Alcaligenes viscosus* NRRL B-182	2.5%	Stauffer and Leeder, 1978
แซนแทนกัม	6% แลกโทส	*Xanthomonas campestris* NRRL B-1459	38.3%	Stauffer and Leeder, 1978
กาแลกโทกลูแคน	6% แลกโทส	*Zoogloa ramigera* NRRL B-3669	55.6%	Stauffer and Leeder, 1978
พอลิเมอร์ของ กาแลกโทส กลูโคส และกรดกลูคูโรนิก	6% แลกโทส	*Arthrobacter viscosus* MRRL B-1973	0.7%	Stauffer and Leeder, 1978

* n.a. : data not available

ที่มา : Margaritis and Pace (1985)

Sutherland (1977) รายงานว่า น้ำหนักโมเลกุลของ EPS ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ โดยฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่ผลิตจากซูโครส และมีสมบัติทางเคมีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของอาหาร ระยะเวลาในการเจริญ ความเข้มข้นของซูโครส และการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดสายพอลิแซ็กคาไรด์

Cerning และคณะ (1992) รายงานว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* เมื่อเลี้ยงในนมที่ผ่านการแยกเอาโปรตีนและไขมันออกบางส่วนพบว่า ถ้ามีการเติม casamino acids 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกลูโคส หรือซูโครสอยู่ด้วย จะทำให้การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น และได้สรุปว่าการเติมกลูโคส หรือซูโครส จะทำให้เชื้อสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากขึ้น

Oikawa และคณะ (1995) รายงานว่า *Acetobacter xylinum* KU-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แมนนิทอล และอะราบิทอล เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้แมนนิทอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อให้ผลผลิตเซลลูโลสมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 3 เท่า และการใช้อะราบิทอล 1.5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อให้ผลผลิตเซลลูโลสมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นคาร์บอนถึง 6 เท่า

Robert และคณะ (1995) รายงานว่า การผลิต EPS โดย *Bifidobacterium longum* BB-79 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีประจุลบ และสามารถผลิต EPS ได้สูงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยการนำไปไดแอลิซิส จากนั้นทำให้แห้งด้วยไลโอฟิไลเซอร์ และทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการผ่าน anion exchange และ gel – filtration chromatography นำ EPS ที่ได้ไปตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วย GLC-mass spectrography พบว่า EPS มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200,000 ดาลตัน โดย EPS ที่ผลิตได้มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบ คือ กาแลกโทส และเฮกโซส ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ โดยอาจเป็นกลูโคสปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในแลกโทส สามารถผลิต EPS ได้สูงสุด

Manca de Nadra และ Strasser de Saad (1995) รายงานว่า *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จากไวน์ สามารถผลิต EPS ได้จากน้ำตาลหลายชนิด คือ กลูโคส ฟรักโทส และซูโครส แต่ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากซูโครสจะสูงที่สุด

Grobben และคณะ (1995) รายงานว่า การผลิต EPS จาก *Lactobacillus delbrueckckii* subsp. *bulgaricus* เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคส และพบว่ากลูโคสเป็นสารที่จำกัด (limiting reagent) เมื่อมีปริมาณต่ำกว่า 18 กรัมต่อลิตร

Kojima และคณะ (1998) รายงานว่า *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidan* และ *Acetobacter xylinum* subsp. *nov* BPR 2001 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่เจริญและสร้างเซลลูโลสในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส และพบว่าต่างจาก *Acetobacter* sp. อื่น คือ ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเทต และแลกเทต ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้

Santos และคณะ (2000) รายงานว่า การผลิตเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* NRRLB512 (f) โดยใช้วิธีการหมักแบบแบชและแบบต่อเนื่องพบว่า การเจริญของเซลล์ไม่ถูกยับยั้งเมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสมากขึ้น แต่ความเข้มข้นของซูโครสที่มากกว่า 40 กรัมต่อลิตรขึ้นไป มีผลทำให้การนำผลผลิตออกจากเซลล์ยากขึ้น

Celik และคณะ (2008) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* G1 และ *Pseudomonas putida* G12 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส แมนโนส ฟรักโทส และไซโลส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของไซโลสตั้งแต่ 2 – 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าสายพันธุ์ G1 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 368 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่สายพันธุ์ G12 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 262 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลส ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.3 **แหล่งไนโตรเจน** (nitrogen source)

เซลล์แบคทีเรียมีองค์ประกอบของไนโตรเจนประมาณ 8 - 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และออกซิเจน เป็นต้น โดยสารอาหารไนโตรเจนสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ถ้าปริมาณของไนโตรเจนในอาหารมากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (BeMiller and Whistler, 1996) แหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ ประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น beef extract, peptone, tryptone, soybean hydrolysate, soytone, casamino acid และ corn steep liquor เป็นต้น

Abbad และคณะ (1995) รายงานว่า การผลิต EPS โดย *Bifidobacterium longum* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแลกโทสเป็นองค์ประกอบ สามารถผลิต EPS ได้ 140 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถสร้างได้มากที่สุดเมื่อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นเพปโทน กับสารสกัดจากยีสต์ โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ในการควบคุมความเป็นกรด-เบส และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 1.2 เมกกะดาลตัน และ 0.36 เมกกะดาลตัน

Oikawa และคณะ (1995) รายงานว่า การใช้ทริปโทนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ในการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าที่ใช้ทริปโทนหรือสารสกัดจากยีสต์อย่างใดอย่างหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้พอลิเพปโทนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ในการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* KU-1 พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าเดิมถึง 2 เท่า

Msuoka และคณะ (1996) รายงานว่า การศึกษาผลของกรดอะมิโนต่อการผลิตเซลลูโลสโดยการเปรียบเทียบกับ corn steep liquor ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด เนื่องจากมีกรดอะมิโนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ พบว่า ในอาหารที่มีเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว มีปริมาณเซลลูโลสใกล้เคียงกับอาหารที่มีกรดอะมิโนทั้ง 14 ชนิด และในอาหารที่ไม่มีเมไธโอนีนจะมีปริมาณเซลลูโลสที่ต่ำกว่ามาก นอกจากนี้ยังได้ทดลองแปรปริมาณเมไธโอนีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ระดับ คือ 0 0.0025 0.005 และ 0.0075% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าปริมาณเมไธโอนีนที่ใช้คือ 0.005% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญของเชื้อและการผลิตเซลลูโลสดีที่สุด

Behravan และคณะ (2003) รายงานว่า กากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาล และสารสกัดจากรำข้าวสาลี (wheat bran extract) สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกและหาได้ทั่วไปในท้องถิ่น โดยทดลองแปรผันความเข้มข้นเพื่อหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ NRRL B-512 รวมทั้งทดลองแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลและรำข้าวสาลีที่เหมาะสมคือ 20% และ 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม คือ 7.5 โดยสามารถผลิตได้เดกซ์แทรนได้ 9.44 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของซูโครส

Banik และคณะ (2007) รายงานว่า องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 เพื่อผลิตเจลแลน ประกอบด้วย กากน้ำตาล ทริปโทน casamino acid ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต และแมงกานีสคลอไรด์ ปริมาณ 112.5 1.0 1.0 1.0 และ 0.947 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสามารถผลิตเจลแลนได้ถึง 13.814 กรัมต่อลิตร

2.4.4 อุณหภูมิ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การผลิต EPS ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสูงขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณมาก และที่อุณหภูมิต่ำ (Sutherland, 1977; Souw and Demain, 1979; Shu and Yang, 1990) อย่างไรก็ตาม สำหรับแบคทีเรียบางชนิด ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละสายพันธุ์อาจแตกต่างกันไป บางสายพันธุ์อาจจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ดีที่ภาวะที่ไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น ภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนน้อยและจำกัดในขณะที่ปริมาณน้ำตาลสูง (Sutherland, 1979; Cerning, 1990) หรือเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต (Cerning, 1992)

ผลของภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลไกการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อแตกต่างกัน เช่น หากการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ (growth-assosiated) ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อให้ได้ปริมาณมาก ควรจะเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการที่จะทำให้ช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นไปได้นาน ในขณะที่เชื้อมีอัตราการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูง (Andaloussi และคณะ, 1995)

Garcia-Garibay และ Marshall (1991) รายงานว่า การผลิต EPS จาก *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* เมื่อเจริญที่ภาวะต่าง ๆ พบว่าอุณหภูมิสูงทำให้การสร้าง EPS ต่อเซลล์ต่ำ นอกจากนี้การเติม hydrolysed casein ในอาหาร MRS เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า EPS มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน

Cerning (1991) รายงานว่า การคัดแยกและศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria พบว่า เชื้อที่สามารถสร้างเมือกเหนียว ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* และ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ผลิตเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส กาแลกโทส แมนโนส และแรมโนส โดยสามารถผลิตได้ประมาณ 30 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในน้ำนม นอกจากนี้ยังพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิต EPS ได้ปริมาณมากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 50 – 60% และการเติมกลูโคสหรือซูโครส ลงในน้ำนมหรือหางนมจะมีผลช่วยเสริมการผลิต EPS

Grobben และคณะ (1995) รายงานว่า *Lactobacillus delbrueckckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 สามารถผลิต EPS เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส หรือแลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส กาแลกโทส และแรมโนส ในอัตราส่วน 1 : 6.8 : 0.7 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิสูงจะมีการผลิต EPS สูงขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 47 องศาเซลเซียส เชื้อจะสูญเสียความสามารถในการผลิต EPS โดยมีลักษณะการผลิตแบบ growth-related และการมีแหล่งคาร์บอนปริมาณมากไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

Van den Berg และคณะ (1995) รายงานว่า การผลิต EPS โดย *Lactobacillus sake* O-1 เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส และแรมโนส ในอัตราส่วน 3 : 2 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 6×10^6 ดาลตัน และเมื่อนำ EPS มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า EPS ที่ผลิตได้มีความข้นหนืดมากกว่าแซนแทนกัม เมื่อวัดความหนืดด้วยความเร็วรอบในช่วง 0 – 300 รอบต่อนาที นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองโดยใช้วิธีการหมักแบบแบช (batch culture fermentation) เพื่อศึกษาอัตราการผลิต EPS พบว่าอัตราการผลิตสูงสุด 1.4 กรัมต่อลิตร ในภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 5.8 และเมื่อเลี้ยงเชื้อ

ที่อุณภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิต EPS ต่อกรัมของมวลชีวภาพ (biomass) เพิ่มขึ้นจาก 600 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็น 700 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่อัตราการเจริญในระยะเอกซ์โพเนนเชียลลดลงจาก 0.16 เป็น 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเริ่มมีการผลิต EPS เมื่อเข้าสู่ในช่วงเริ่มต้นของ growth phase และเมื่อศึกษาการเจริญโดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กาแลกโทส แมนโนส ฟรักโทส และซูโครส พบว่าองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกัน

2.4.5 **ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น** (pH)

ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุมก่อนการหมัก เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิต EPS ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเป็นกลาง (Roseiro, 1992)

Oikawa และคณะ (1995) รายงานว่า จากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-เบสต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. โดยการแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในช่วง 3.0 - 8.0 พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับผลิตเซลลูโลส คือ 5.0 เมื่อใช้อะราบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Karthikeyan และคณะ (1996) รายงานว่า ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนโดยใช้วิธีการหมักแบบแบช มีดังนี้ สารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรน ประกอบด้วย ซูโครส สารสกัดจากยีสต์ และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ปริมาณ 300 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม คือ 8.3 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 23 องศาเซลเซียส โดยปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จากการหมักด้วยวิธีนี้ คือ 154 มิลลิกรัมต่อลิตร

Kim และคณะ (2003) รายงานว่า ความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิ ในการเลี้ยง *L. mesenteroides* B512FMCM มีผลต่อการผลิตเดกซ์แทรนขนาดโมเลกุลต่าง ๆ และการเกิดกิ่งสาขาของเดกซ์แทรน โดยพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส จะส่งผลให้มีการผลิตเดกซ์แทรนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง (low – molecular weight dextran; LMWD (น้อยกว่า 10^5 ดาลตัน)) และเกิดการสร้างกิ่งสาขาเพิ่มขึ้น สำหรับผล

ของอุณหภูมิในช่วงทดลอง (4 – 45 องศาเซลเซียส) พบว่าไม่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของเดกซ์แทรนมากนัก แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลต่อการเกิดกิ่งสาขาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ การปรับค่าความเป็นกรด-เบสในช่วง 4.5 – 6.0 จะไม่มีผลทั้งขนาดโมเลกุลและการเกิดกิ่งสาขาของเดกซ์แทรน โดยการควบคุมการผลิตเดกซ์แทรนให้มีลักษณะที่แตกต่างกัน จะเป็นแนวทางสำคัญในการนำเดกซ์แทรนชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์

Bueno และ Garcia-Cruz (2006) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. และ *Arthrobacter* sp. จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ 3B 4B 7B 21B 18E และ 21D ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ และจากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 5.0 เป็น 7.0 แต่ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 8.0 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าลดลง

Ayala-Hernandez และคณะ (2008) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (JFR1) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น 5.5 มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 6.5

2.4.6 ออกซิเจน

ออกซิเจนที่เข้าร่วมในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์จุลินทรีย์ จะอยู่ในรูปของโมเลกุลของออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolve oxygen molecule : DO) โดยออกซิเจนก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับกลูโคส แต่ที่ออกซิเจนแตกต่างจากสารอาหารอื่น คือ การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด เช่น ในการหมักปกติสามารถละลายกลูโคสได้ถึง 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ออกซิเจนละลายได้น้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศเข้าสู่เซลล์มีหลายขั้นตอน ดังนี้

1) การส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในอาหารเหลว
2) การส่งผ่านออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวไปยังเซลล์จุลินทรีย์
3) การดูดซึมออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์

โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของการสร้างพลังงาน และถูกกระตุ้นจากไซโทโครมออกซิเดส ในกระบวนการหายใจ

จากการศึกษาการผลิตแซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ โดยแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Atkinson and Mavituna, 1983; Cerning, 1990)

Watanabe และ Yamanaka (1995) รายงานว่า จากการศึกษาผลของออกซิเจนต่ออัตราการผลิตและลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ภายใต้ภาวะนิ่ง (static culture) ในถังหมัก พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณออกซิเจนที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (oxygen tension) มีค่าเท่ากับ 10 – 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ผิวหน้าให้อยู่ในช่วง 15 – 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์คงที่ และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสโดยใช้ scanning electron microscopy (SEM) พบว่าความหนาแน่นของเส้นใยที่ภาวะ oxygen tension เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์มีมากที่สุด และความหนาแน่นของแผ่นเซลลูโลสจะลดลงเมื่อ oxygen tension เพิ่มขึ้น

Chao และคณะ (2000) รายงานว่า จากการศึกษาการผลิตเซลลูโลสใน 50 L Internal – loop airlift reactor โดยใช้ *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift มีค่าเท่ากับ 0.0567 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมากกว่าการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ agitated – stirred fermenter และเมื่อมีการเติมออกซิเจนในอากาศที่ให้แก่ถังหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอากาศที่ให้แก่ระบบ พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม (Monica, 2003)

พอลิแซ็กคาไรด์	ระบบเลี้ยงเชื้อ	ภาวะเลี้ยงเชื้อ	อาหารเลี้ยงเชื้อ
แอลจิเนต	แบบต่อเนื่อง	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 7.2 ให้อากาศแก่ระบบ (ออกซิเจนในปริมาณที่มากเกินพอ ไม่กระตุ้นการสังเคราะห์ EPS) มีการเขย่า	ซูโครส (20 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตEPS สูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อจำกัดปริมาณโมลิบดีนัม (molybdenum) และฟอสฟอรัสในระบบ
เดกซ์แทรน	แบบแบช	อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการเจริญของเชื้อ และอุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส สำหรับการผลิต EPS) ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 (สำหรับการผลิต EPS) ไม่มีการให้อากาศในช่วงกระตุ้นการผลิต EPS	ซูโครส (5-10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณมากจะกระตุ้นการสังเคราะห์ EPS
แซนแทนกัม	แบบแบชหรือแบบต่อเนื่อง	อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ให้อากาศแก่ระบบ (0.5 - 0.75 ลิตรต่อนาทีในช่วงแรก จากนั้น 0.75 - 1.5 ลิตรต่อนาทีในช่วงที่ความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น) มีการเขย่า	กลูโคส (2 – 3.5 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน มีไนโตรเจน ซัลเฟอร์หรือฟอสฟอรัสในปริมาณที่จำกัด ควบคุมอัตราการเจือจาง

การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ในปริมาณมาก ๆ นั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงความคุ้มทุน อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งสำหรับค่าใช้จ่ายในการผลิต ทั้งนี้สูตรอาหารที่จะใช้ในอุตสาหกรรมควรมีราคาถูกและให้การเจริญตลอดจนการผลิตสารที่ต้องการได้ดี ปกติแล้วการเข้าสู่สูตรอาหาร ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงอย่างมาก คือ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาจเตรียมได้จากผลิตภัณฑ์เหลือใช้ทางการเกษตร ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนยังอาจเป็นชนิดอินทรีย์ อนินทรีย์ หรือร่วมกัน โดยไนโตรเจนอินทรีย์ก็สามารถเตรียมได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือแหล่งที่มีราคาถูกอื่น ๆ ได้

สืบเนื่องจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม หลังฤดูการเก็บเกี่ยวแต่ละปีจะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ ชานอ้อย กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวัน เหลือเป็นจำนวนมาก และจากการที่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ (ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ และชานอ้อย) มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เช่น ชานอ้อย มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากถึง 33-41% (Paturua, 1989) ฟางข้าว มี 32.1 - 36% (Virkola, 1975) เป็นต้น จึงมีการศึกษาเพื่อนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นสับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ เช่น แอลกฮอลล์ กรดอะซีติก และกรดอินทรีย์อื่น ๆ ส่วนกากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวัน มีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (สุภาพร ชาติวรพงศา, 2536)

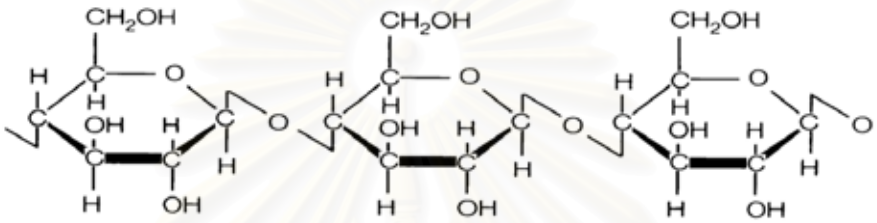
2.5 ส่วนประกอบในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสิก (lignocellulosic material) มีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ligin) ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และภาวะที่เจริญเติบโต (ชมพูนุช หาญนันทวิวัฒน์, 2547)

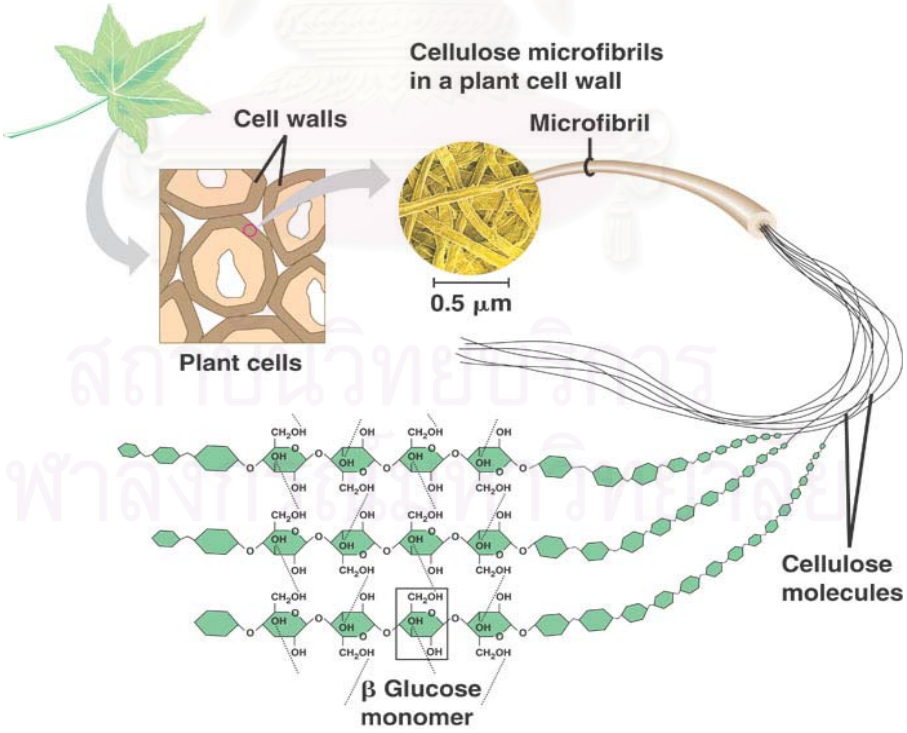
2.5.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคซิดิก เป็นสายตรง ไม่มีแขนงย่อย (unbranched polymer) มีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่ให้ความแข็งแรงในพืช โดยธรรมชาติของพืชจะไม่พบเซลลูโลสอยู่ในรูปอิสระ แต่มักพบอยู่ร่วมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโทแซน (pentosans) กัม

(gum) แทนนิน (tannin) ไขมัน และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Paturau, 1989) การจัดเรียงตัวของหน่วยดี-กลูโคสจะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วย พันธะไฮโดรเจน (Intra molecule H-bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Intermolecular H-bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลดี-กลูโคสในอีกสาย (Nisizawa, 1973) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 ลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส (http://www. greenspirit.org.uk)



รูปที่ 2.3 เซลลูโลสในเซลล์พืช (http://www. learners.in.th)

จำนวนหน่วยของกลูโคสในสายของเซลลูโลสไม่สามารถทราบจำนวนที่แท้จริงได้ แต่ประมาณได้ว่าต้องมีจำนวนมาก ตั้งแต่ 1,000 ถึง 10,000 หน่วยกลูโคส แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (Tsao and Chiang, 1983) เช่น degree of polymerization ของเซลลูโลสในไฟเบอร์ของพืชจำพวกฝ้ายและป่าน มีจำนวนหน่วยกลูโคส ตั้งแต่ 6,500 ถึง 9,000 หน่วย (Meyer, 1961)

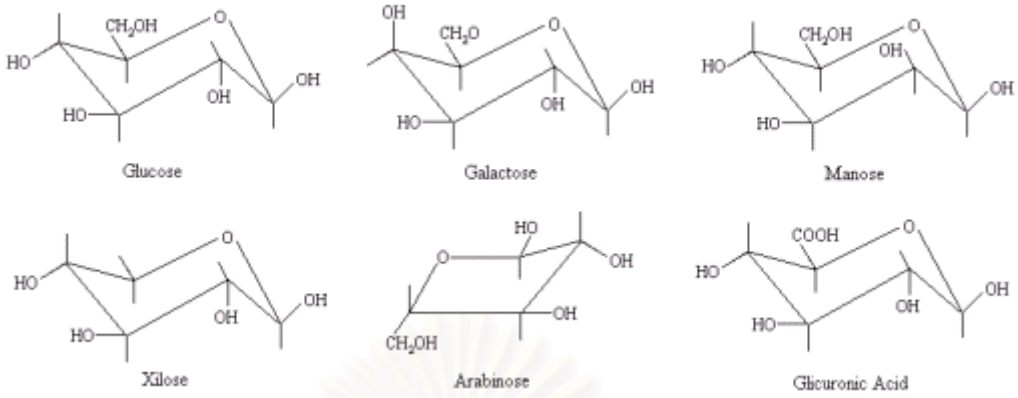
ผนังของเซลล์พืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน ที่ไม่ละลายน้ำและสารอินทรีย์ชนิดใด โดยจะอยู่รอบเซลลูโลส และทำหน้าที่ป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย นอกจากนี้ ยังมีพอลิแซ็กคาไรด์อื่นที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน แมนแนน พอลิยูโรไนด์ อะราบิแนน และกาแลกแตน แต่มักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส (Gokoyr และ Ereken, 1986)

เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อน และไม่ละลายน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายเบสอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดหรือเบสแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามการละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้เป็น 3 ชนิด (Paturua, 1989) คือ

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน 17.5% ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้อง
2. บีตา-เซลลูโลส (β-celulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายใน 17.5% ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ตกตะกอนได้ง่ายเมื่อสารละลายมีสภาพเป็นกรด
3. แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายใน 17.5% ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรด แต่สามารถตกตะกอนได้ในแอลกฮอลล์

2.5.2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สามารถละลายใน 17.5% ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เย็น ได้ (Paturau, 1989) เฮมิเซลลูโลสไม่ใช่สารเริ่มต้นของเซลลูโลส และไม่ได้เป็นส่วนใดส่วนหนึ่งในกระบวนสังเคราะห์เซลลูโลส แต่เฮมิเซลลูโลสเป็นกลุ่มของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วย น้ำตาลตั้งแต่ 2 – 4 ชนิดขึ้นไป มีทั้งน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส น้ำตาลที่พบมากที่สุด คือ ไซโลส และอะราบิโนส นอกจากนั้นยังพบกลูโคส แมนโนส กาแลกโทส และกรดกลูคูโรนิก เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช โดยรวมอยู่กับลิกนินและเซลลูโลส มีสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในสารละลายเบส (Paturau, 1989; Kirk, 1983) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



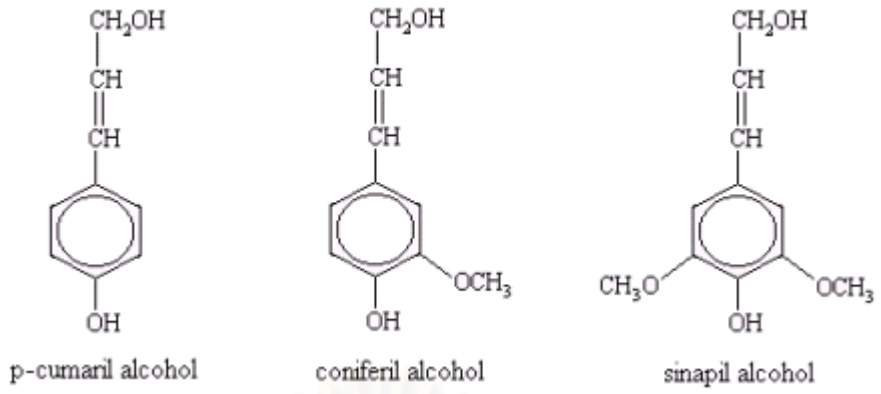
รูปที่ 2.4 ตัวอย่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส

(http:// www.engin.umich.edu)

ในรำข้าวสาลีประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสประมาณ 43% ของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด และโครงสร้างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วย อะราบิโนส 59% ไซโลส 38.5% และกรดกลูคูโรนิก 9% และเป็นสายแขนงของอะราโบไซแลนเป็นส่วนใหญ่ ในโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลประมาณ 300 หน่วย (DeMan, 1990)

2.5.3 โครงสร้างของลิกนิน

ลิกนินไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต แต่จะทำหน้าที่เคลือบผนังเซลล์พืช ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) หรือเรียกว่าเป็น ฟีโนลิกพอลิเมอร์ (phenolic polymer) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ที่ตำแหน่งแอลฟา และบีตาของโมเลกุลลิกนินอาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุล หรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอล อาจเกิดพันธะกับคาร์บอนในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายพอลิเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลลิกนิน ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอล หรือ เมทานอลที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปกติลิกนินจะอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบเซลลูโลส โดยเป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยอีกด้วย (Biely, 1985)



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างองค์ประกอบของลิกนิน (http:// www.engin.umich.edu)

2.6 การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทำได้ 2 วิธี คือ การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis) และการย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

2.6.1 การย่อยด้วยสารเคมี

เป็นการย่อยด้วยสารละลายกรดหรือสารละลายเบส โดยจะเกิดปฏิกิริยาการทำลายพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาล เมื่อนำมาทำการย่อยจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ถ้าเซลลูโลสถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ จะได้กลูโคลเพียงอย่างเดียว ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อย จะให้น้ำตาลเพนโทสหลายชนิดปนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

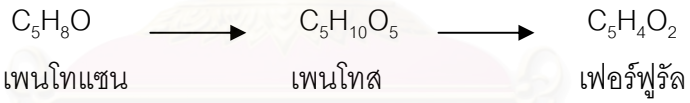
การย่อยด้วยสารเคมีแบ่งตามวิธีของ Paquot และคณะ (1984) ได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.6.1.1 การย่อยด้วยกรด (Acid Hydrolysis) แบ่งเป็น 2 กระบวนการ ดังนี้

2.6.1.1.1 Homogeneous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้ คือ กลูโคส แต่มีข้อเสีย คือ ต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และจะมีปัญหาด้านการผุกร่อนของเครื่องมือ

2.6.1.1.2 Heterogeneous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนกว่า แต่ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส วิธีนี้ไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ได้ นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมผลิตไฮโดรเซลลูโลส (hydrocellulose) และ gel – form microcrystalline cellulose แต่จะให้ผลผลิตต่ำ (50 – 55%)

การย่อยด้วยกรด จะทำให้เพนโทแซนในเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นเฟอร์ฟูรัล (furfural) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Paturau, 1989) ดังสมการ



2.6.1.2 การย่อยด้วยเบส (Alkaline Hydrolysis)

สารละลายเบสที่นิยมใช้ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง แอมโมเนีย และเอทิลีนไดอะมีน (ethylene diamine) เป็นต้น การใช้เบสย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะมีผลทำให้สายของพอลิแซ็กคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้เกิดในสภาพอุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยเพื่อใช้ในการย่อยเฮมิเซลลูโลส

2.6.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือเซลลูโลส คือ เซลลูเลส (Woodward, 1987) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งรา และแบคทีเรีย แต่เอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ เซลลูเลสจากรา โดยเฉพาะ *Tricoderma viride* หรือภายหลังจัดอยู่ใน *T. reesei* (Parisi, 1989)

2.6.2.1 สมบัติของเซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด (Ryu และ Mandel, 1980) คือ

1. Endo-β-1,4 glucan glucanohydrolyase (E.C. 3.2.1.4) หรือ เอนโดกลูคาเนส หรือ C_x ทำหน้าที่ตัดพันธะ β - 1,4 ไกลโคซิดิก ภายในสายเซลลูโลสในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส โดยเป็นการตัดแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเซลโลไบโอส และมีกลูโคสบ้างเล็กน้อย

2. Exo-β-1,4 glucan cellobiohydrolase หรือ เอกโซกลูคาเนส หรือ C_1 (E.C. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ตัดพันธะ β - 1,4 ไกลโคซิดิก จากปลายทางด้าน non-reducing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส และเซลโลไบโอส

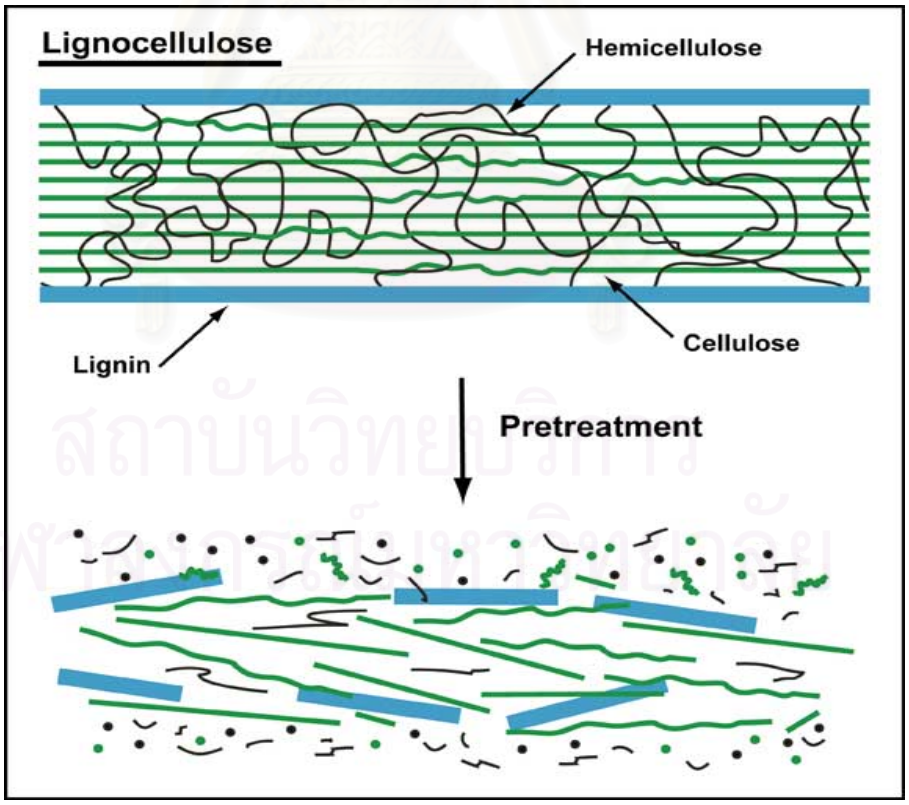
3. β-Glucosidase หรือ เซลโลไบเอส (E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส และเซลโลเดกซ์ทรินได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

Dwivedi และ Ghose (1979) รายงานว่า จากการศึกษากลไกการย่อยเซลลูโลสในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเซลลูเลสจาก *T. reesei* QM 9414 พบว่า เอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส จะถูกดูดซับอยู่บนผิวของชานอ้อยบริเวณที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble crystalline bagasse) เป็นขั้นตอนแรก โดยจะตัดสายเซลลูโลส (depolymerization) จากปลายด้าน non-reducing ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเซลโลไบโอส และกลูโคสบ้างเล็กน้อย จากนั้นจะปลดปล่อยน้ำตาลที่ได้ออกมาอยู่ในสารละลาย เพื่อทำปฏิกิริยากับบีตา-กลูโคซิเดส เพื่อเปลี่ยนเซลโลไบโอส ให้เป็นกลูโคส

2.6.2.2 การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์

เซลลูโลสจากพืช หรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด จะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส ได้แก่ ดีกรีของผลึก (degree of crystallinity) จำนวนหน่วยกลูโคสในสายเซลลูโลส (degree of polymerization) การอมน้ำ (degree of water swelling) และพื้นที่ผิว เป็นต้น สิ่งเหล่านี้จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเซลลูเลสไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงต้องทำการปรับสภาพ (pretreat) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

การปรับสภาพวัสดุวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เป็นการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ด้วยการทำลายโครงสร้างผลึกในเซลลูโลส และโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต กำจัดลิกนิน เพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ง่ายขึ้น และเพิ่มจำนวนพันธะไกลโคซิดิก เพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ง่าย (Dekker และ Wallis, 1983; Woodward, 1987; Pirisi, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสิก (lignocellulosic material)
(http://www.biomassmagazine.com)

วิธีการปรับสภาพ แบ่งได้เป็น 2 วิธี (Pirisi, 1989) คือ วิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment) และวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

2.6.2.2.1 วิธีทางกายภาพ ประกอบด้วย

(1) การบด คัด ลดขนาดวัตถุดิบ เป็นการบดผลึกของเส้นใยเซลลูโลสให้แตกออก เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น รวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำการย่อยได้ง่ายขึ้น จากการศึกษาของ Kelsey and Shafizadeh (1980) พบว่าการบดวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น

(2) การใช้ความร้อน และความดัน เป็นการทำให้เซลลูโลสในวัตถุดิบอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง แล้วลดความดันทันที ทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็วจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มขนาด เพื่อให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา เรียกว่า “ Steam Explosion Process ”

2.6.2.2.2 วิธีทางเคมี

การใช้สารเคมีจะทำให้ปริมาณลิกนิน และผลึก (crystalline) ลดลงและทำให้เซลลูโลสมีการละลายน้ำ หรืออมน้ำมากขึ้น Manonmani และ Sreekantieh (1987) รายงานว่าจากการศึกษาการใช้เบส โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน (autoclave) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณลิกนินได้ถึง 80.69% และเมื่อนำไปย่อยด้วยเซลลูเลสจาก *T. viride* ความเข้มข้น 1.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-เบส 4.8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 87.75%

Yanez และคณะ (2004) รายงานว่า จากการศึกษาการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจาก corrugated cardboard เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 3% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ปริมาณเฮมิเซลลูโลสลดลงจากเดิม 13.8 เหลือเพียง 4.7% โดยน้ำหนัก แต่ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจากเดิม 59.7 เป็น 75.1% โดยน้ำหนัก ในสารละลายจึงประกอบด้วยน้ำตาลที่ได้จากเฮมิเซลลูโลส และกลูโคส

Xiao และคณะ (2004) รายงานว่า จากการศึกษาผลกระทบของการยับยั้งของกลูโคสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น ๆ ที่มีต่อเซลลูเลสและบีตากลูโคซิเดส พบว่า เมื่อปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การยับยั้งแอกทิวิตีของเซลลูเลสและบีตากลูโคซิเดสเพิ่มตาม ในขณะที่แมนโนส ไซโลส และกาแลกโทส ไม่มีผลยับยั้งแอกทิวิตีของบีตากลูโคซิเดส แต่มีผลต่อแอกทิวิตีของเซลลูเลส

Varga และคณะ (2004) รายงานว่า จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพโดยใช้ความดันของเปลือกข้าวโพด (corn stover) เพื่อเพิ่มความสามารถในย่อยของเซลลูเลส พบว่าการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดโดยใช้อุณหภูมิสูงร่วมกับการใช้กรดซัลฟูริกจะสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าการใช้อุณหภูมิเพียงอย่างเดียว โดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 2% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 56.1 กรัมต่อ 100 กรัมสารตั้งต้น

Saha และคณะ (2005) รายงานว่า การย่อยสลายฟางข้าวสาลี ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 0.75% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และไม่พบสารเฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล

Davis และคณะ (2005) รายงานว่า การย่อยสลาย wheat stillage ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นมากกว่า 1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร จะพบเฟอร์ฟูรัลเกิดขึ้น แต่เมื่อทำ detoxification ปรับค่าความเป็นกรด-เบสของไฮโดรไลเสตที่ได้ ให้อยู่ในช่วง 1.5 – 5.0 โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าจะช่วยลดปริมาณสารเฟอร์ฟูรัลได้ถึง 55% เมื่อครบเวลา 5.5 ชั่วโมง

Sun และ Cheng (2005) รายงานว่า การปรับสภาพฟางไรย์ (rye straw) และหญ้า bermuda โดยใช้กรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1.5% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นนำไปย่อยด้วยเซลลูเลส และบีตากลูโคซิเดส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 197.1 และ 229.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Wen และคณะ (2005) รายงานว่า จากการศึกษาการใช้เซลลูเลสผสมของเชื้อรา *T. reesei* และ *A. phoenicis* พบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสที่ประกอบด้วยบีตากลูโคซิเดส

ค่อนข้างสูง ทำให้การย่อยเซลลูโลสมีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลลูเลสทางการค้า (Celluclast®) และเซลลูเลสจาก *T. reesei* เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 2.7 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียระหว่างการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดและด้วยเอนไซม์ (Parisi, 1989)

การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเอนไซม์	การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรด
ข้อดี 1. ภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสไม่รุนแรง 2. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกย่อยเปลี่ยนเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น เฟอร์ฟูรัล 3. สามารถหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ 4. ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนการกัดกร่อน หรือราคาแพง	**ข้อดี** 1. วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรไม่ต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็ว ง่าย และสั้น 3. ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ (catalyst) มีราคาถูกและหาง่าย 4. ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ถ้าใช้กรดแก่) 5. ให้ผลิตภัณฑ์สูง (ถ้าใช้กรดแก่)
ข้อเสีย 1. วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งปฏิกิริยาของตัวเองได้ (product inhibition) 3. สูญเสียเอนไซม์ไปเนื่องจากถูกดูดซับอยู่บนวัสดุที่ไม่ถูกย่อย	**ข้อเสีย** 1. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เจาะจง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่บริสุทธิ์ 2. น้ำตาลที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เฟอร์ฟูรัล ที่เป็นพิษต่อเซลล์ 3. ต้องใช้อุณหภูมิสูง (ถ้าใช้กรดอ่อน) 4. กรณีใช้กรดแก่ จำเป็นต้องมีกระบวนการแยกกรดออก (recovery) มีราคาสูง 5. ก่อนนำน้ำตาลไปใช้จำเป็นต้องมีกระบวนการทำน้ำตาลให้เป็นกลางก่อน 6. ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สามารถทนกรดได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
3. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
4. 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
5. 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
6. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -70 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert, Germany
9. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
10. เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Japan
11. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Japan
12. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert, Germany
13. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
14. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
15. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

16. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
17. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
18. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
19. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany
20. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
21. เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer/hot plate) รุ่น 502P-2 บริษัท Mettler Toledo., USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxy methyl cellulose) บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA.
2. ซาลิซิน ($C_{13}H_{18}O_7$) บริษัท Sigma Chemical Co., Hong Kong
3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
4. สารสกัดจากยีสต์ บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
6. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมคาร์บอเนต บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมอะซิเตต บริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมไนเตรต บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
10. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany
11. กรดไดไนโตรสาลิไซลิก บริษัท Fluka Chemika, Switzerland
12. กรดอะซิติก บริษัท Merck, German
13. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
14. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต บริษัท Merck, Germany
15. สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ บริษัท Merck, Germany
16. ซูโครส บริษัท Merck, Germany
17. กลูโคส บริษัท Merck, Germany
18. ฟรักโทส บริษัท Fluka, Switzerland
19. ไซโลส บริษัท Difco, USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
20. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต บริษัท Merck, German
21. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
22. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
23. โพแทสเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
24. แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
25. แอมโมเนียมคลอไรด์ บริษัท Ajax Chemicals, Australia
26. แอมโมเนียมไนเตรต บริษัท Mallinckrodt Baker, Inc., USA
27. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
28. กรดบอริก บริษัท Merck, Germany
29. เมธิลเรด บริษัท Merck, Germany

30. เมธิลลีนบลู บริษัท Merck, Germany

3.3 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย 7 ชนิด คือ

1. ชานอ้อย
2. ฟางข้าว
3. แกลบ
4. รำข้าว
5. กากถั่วเหลือง
6. กากเมล็ดทานตะวัน
7. กากงา

3.4 เอนไซม์

1. เซลลูเลส จาก *Trichoderma reesei*
   บริษัท Genencor, Finland ยี่ห้อ GC220
2. แอลฟา-อะไมเลส จาก *Geobacillus stearothermophillus*
   บริษัท Genencor International ยี่ห้อ SPEZYME®ETHYL
3. กลูโคอะไมเลส จาก *Aspergillus niger*
   บริษัท Genencor International ยี่ห้อ DISTILLASE®L-400
4. อินเวอร์เทส จาก *Saccharomyces cerevisiae*
   บริษัท สยามวิคตอรี่ เคมิคอล จำกัด ยี่ห้อ BIOZYME INVERT L10,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.5.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 คัดแยกได้จากอ้อย อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.5.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.5.1.2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เขี่ยเชื้อ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ลงบนอาหารแข็งตามวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และเขี่ยเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใหม่ทุก 2 สัปดาห์

3.5.1.2.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เขี่ยเชื้อ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ลงบนอาหารเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 - 1.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น (ภาคผนวก ก) ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

3.5.2.1 ปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220

ปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรตามวิธีของ สุภาพร ชาติวรพงศา (2536) โดยนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดที่ผ่านการอบจนแห้งสนิทดีที่ 80 องศาเซลเซียส มาตัดและ/หรือบดด้วยเครื่องปั่น และทำการปรับสภาพก่อนการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ด้วยวิธีการดังนี้

ฟางข้าวและชานอ้อย ปรับสภาพด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

แกลบและรำข้าว ปรับสภาพด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 และ 10 นาที ตามลำดับ

ล้างวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยน้ำประปา จนกระทั่งน้ำที่ผ่านวัสดุออกมามีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 7.0 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2.2 ศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลส GC220

นำเซลลูเลส GC220 มาวัดแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสตามวิธีของ Ghose (1987) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) และวัดแอกทิวิตีของบีตากลูโคซิเดสตามวิธีของ Sternberg และคณะ (1977) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) หาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมที่สุดต่อแอกทิวิตีเอนไซม์ และปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

3.5.2.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดด้วยเซลลูเลส GC220

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว จากข้อ 3.5.2.1 จำนวน 5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (จารุวรรณ สัมพันธ์วณิช, 2548) มาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 จากข้อ 3.5.2.2 หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกตะกอน วิเคราะห์ปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสด้วยวิธี DNS (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข) หาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด

3.5.2.4 ย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 เพื่อใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว จากข้อ 3.5.2.1 5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบสและปริมาณที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 จากข้อ 3.5.2.2 ด้วยเวลาที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด จากข้อ 3.5.2.3 หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกตะกอน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดด้วยวิธี DNS (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Lyophilizer หรือ Freeze Dryer) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.5.2.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก (ดัดแปลงจากวิธีของ วิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549)

ชั่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว จากข้อ 3.5.2.1 2.5 กรัม เติม 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดด้วยวิธี DNS (ภาคผนวก ข)

3.5.2.6 เตรียมไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 5 กรัม ละลายใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 5.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก จนได้สารละลายใส นำมาย่อยสลายด้วยแอลฟา-อะไมเลส บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อ

ครบเวลาที่กำหนด นำสารละลายมาปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 4.5 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น จากนั้นนำมาย่อยสลายด้วยกลูโคอะไมเลส บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสตด้วยวิธี DNS (ภาคผนวก ข) และเก็บไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.5.2.7 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากน้ำตาลโดยการย่อยด้วยอินเวอร์เทสเพื่อใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

เตรียมกากน้ำตาล 10 % โดยปริมาตร ใน 0.05 โมลาร์อะซิเตรตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 4.5 นำมาย่อยสลายด้วยอินเวอร์เทส บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (ภาคผนวก ข)

3.5.3 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

3.5.3.1 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสตโดยวิธี Kjeldahl (Leonard, 1987)

ชั่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 1 กรัม ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงาที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากโรงงานน้ำมันพืช (กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันได้รับมาจากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด และกากงาได้รับมาจากบริษัท ยูเนียนฟูด อินดัสตรี จำกัด) โดยไม่มีการปรับสภาพใด ๆ และไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร เติมตัวคะตะไลส์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3) 7 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่อง Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 75 มิลลิลิตร นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริกที่ผสมอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 75 -100 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีเขียวใสแล้วจึงนำไปไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไทเทรตจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นม่วงแดง คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน จากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\%\text{ไนโตรเจน} = [(A-B) \times C \times 1.4] / V$$

A คือ ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง B คือ ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเทรต blank
C คือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

3.5.3.2 เตรียมไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (สุภาพร ชาติวรพงศา, 2536)

ชั่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงา 12 กรัมใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติม 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปนึ่งอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปปรับความเป็นกรด-เบสให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้ 10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.5.4 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.5.4.1 เตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

เขี่ยเชื้อ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8 - 1.0 เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.5.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ

3.5.4.2.1 วิเคราะห์การเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำอลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil) ไปอบในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desiccator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก (ส่วนน้ำใส นำไปสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์) นำเซลล์มาใส่ในอลูมิเนียมฟอยล์ข้างต้น และทำให้แห้งในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และรายงานผลที่ได้ในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.5.4.2.2 สกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ (ดัดแปลงจากวิธีของ Moreno และคณะ, 1998)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาเติมเอทานอล ความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ตะกอนขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใส ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาใส่ในอลูมิเนียมฟอยล์ (ที่ผ่านการอบในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักอลูมิเนียมฟอยล์เปล่าด้วยเครื่องชั่งละเอียด) ทำให้แห้งในตู้อบแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์และรายงานผลที่ได้ในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.5.4.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง ไฮโดรไลเสตจากฟางข้าว ไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย กากน้ำตาล โดยปรับให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากันเพื่อทดแทนซูโครสบริสุทธิ์ 4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.4.4 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.4.3 แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต ไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลือง ไฮโดรไลเสตจากกากทานตะวัน และไฮโดรไลเสตจากกากงา โดยปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากัน คือ 0.02 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.4.5 แหล่งวิตามินและเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.4.3 และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.4.4 โดยแปรผันแหล่งวิตามินและเกลือแร่ ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต ทำการทดลอง 4 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
ชุดที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชุดที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งสารสกัดจากยีสต์ 0.1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 %โดยมวลต่อปริมาตร

ชุดที่ 4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีทั้งสารสกัดจากยีสต์และแมกนีเซียมซัลเฟต

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแต่ละชุดมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.4.6 ปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.3 และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.4 โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 1.0 – 5.0 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1.0 2.0 3.0 3.5 4.0 4.5 และ 5.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.4.7 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและปริมาณที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.4.3 และ 3.5.4.6 ตามลำดับ และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.4.4 โดยแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนตั้งแต่ 0.02 – 0.12 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 และ 0.12 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลง (จากข้อ 3.5.4)

3.5.5.1 ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง จากข้อ 3.5.4 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5.5 – 7.5

(5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง จากข้อ 3.5.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 45 องศาเซลเซียส (30 37 40 และ45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.5.1 อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.6 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลง (จากข้อ 3.5.4)

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง จากข้อ 3.5.4 โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิที่ใช้บ่มที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.5 อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 นำน้ำเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.7 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ระหว่างสูตรอาหารเดิมและสูตรอาหารที่ดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 3.5.4)

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก)) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 3.5.4 โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิที่ใช้บ่มที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.5 อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแต่ละชุดมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.8 การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปริมาณ 10 % โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง จากข้อ 3.5.4 ที่ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม จากข้อ 3.5.5 อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ ทำการทดลอง 7 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ชุดที่ 2 แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา

ชุดที่3 แหล่งไนโตรเจน คือ ไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ชุดที่ 4 แหล่งไนโตรเจน คือ ไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา

ชุดที่ 5 แหล่งไนโตรเจน คือ ไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวันและแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน ใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในอาหาร ใน 6 ชั่วโมงต่อมา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชุดที่ 6 แหล่งไนโตรเจน คือ ไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวันและแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน ใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในอาหาร ใน 6 ชั่วโมงต่อมา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ชุดที่ 7 แหล่งไนโตรเจน คือ ไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวันและแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในอาหาร และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแต่ละชุดมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยวิธีตกตะกอนเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.2

3.5.9 **ศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้**

3.5.9.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

ชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (ภาคผนวก ข ข้อ 4)

3.5.9.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.5.9.2.1 ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยกรดซัลฟูริก (ดัดแปลงจากวิธีของวิมลิน ศิริพัฒนานนท์, 2549)

ชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ นำไปผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และเก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และปริมาณกลูโคสด้วยเครื่องวิเคราะห์กลูโคส (glucose analyzer)

3.5.9.2.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ในงานวิจัยหัวข้อนี้ได้ใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี 2 เครื่อง เพื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ดังนี้

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเครื่องที่หนึ่ง ใช้คอลัมน์ Lichrocart NH_2 ขนาด 250 X 4 มิลลิเมตร ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 90 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 85% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเครื่องที่สอง ใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล กรดออร์แกนิค และแอลกอฮอล์ ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 60 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำกลั่นปลอดประจุเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Refractive Index detector

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐานจากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.5.9.3 วิเคราะห์การหลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

วิเคราะห์อุณหภูมิที่หลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยใช้เครื่อง STA 409 C/CD บริษัท Netzsch, Germany และให้ความร้อนกับพอลิแซ็กคาไรด์ (15.630 มิลลิกรัม) ในช่วงอุณหภูมิ 30 - 800 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (N_2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

4.1.1 วิเคราะห์แอกทิวิตีของเซลลูเลส GC220 (Genencor)

จากการนำเซลลูเลส GC220 มาวัดแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสตามวิธีของ Ghose (1987) และวัดแอกทิวิตีของบีตากลูโคซิเดสตามวิธีของ Sternberg และคณะ (1977) และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส และบีตากลูโคซิเดสของเซลลูเลส GC220

เซลลูเลส GC220	แอกทิวิตีของเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
บีตากลูโคซิเดส	507.59	214.84	2.36
เอนโดกลูคาเนส	149.65	214.84	0.70

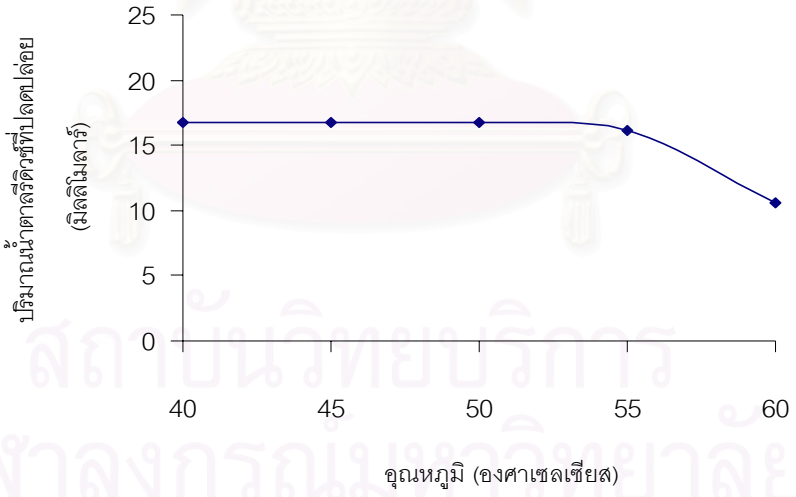
จากตารางที่ 4.1 พบว่าเซลลูเลส GC220 มีแอกทิวิตีของบีตากลูโคซิเดสเด่นกว่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และเพื่อยืนยันข้อมูลของเซลลูเลส GC220 จากทางผู้ผลิต (บริษัท Genencor, Finland) และเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากที่สุด ในการทดลองต่อไปจึงศึกษาอุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส ปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220

4.1.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

งานวิจัยข้อ 4.1.2.1 – 4.1.2.3 ได้เลือกศึกษาการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส GC220 เพื่อเป็นตัวแทนของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ เนื่องจากชานอ้อยเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมากจากกระบวนการหีบอ้อยในโรงงานผลิตน้ำตาล ดังนั้นชานอ้อยจึงเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการใช้ศึกษาแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.1.2.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 โดยนำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ ตามวิธีในข้อ 3.5.2.1 ปริมาณ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตรตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 มาสลายด้วยเซลลูเลส GC220 2.5 และ 0.74 หน่วยเอนไซม์ บีตากลูโคซิเดสและเอนโดกลูคาเนส ตามลำดับ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส ได้ผลดังรูปที่ 4.1

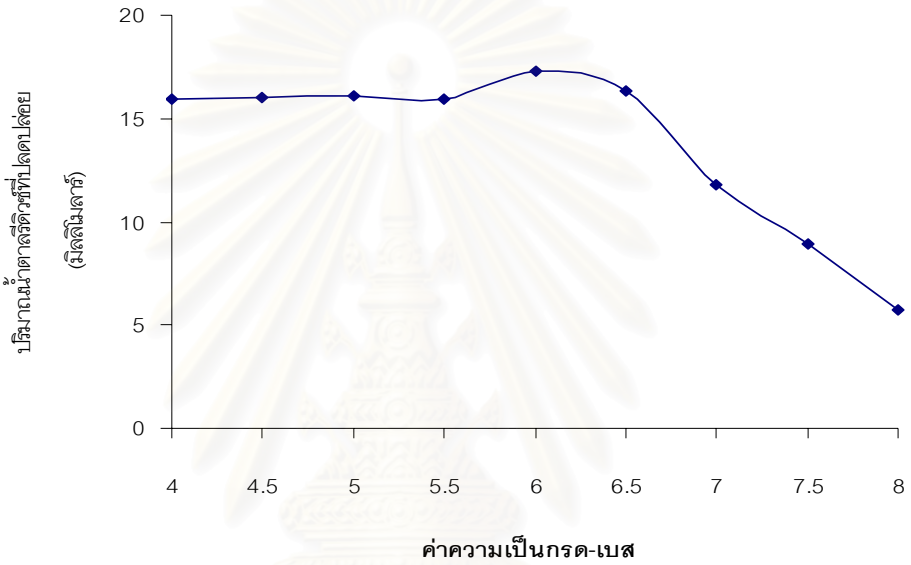


รูปที่ 4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อย ด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.1 พบว่าเซลลูเลส GC220 มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 40 – 55 องศาเซลเซียส โดยเลือกใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในการทดลองต่อไป

4.1.2.2 ผลของค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม

ความเป็นกรด-เบสมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 โดยนำชานอ้อย 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาสลายด้วยเซลลูเลส GC220 2.5 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสในช่วง 4.0 – 8.0 ได้ผลดังรูปที่ 4.2



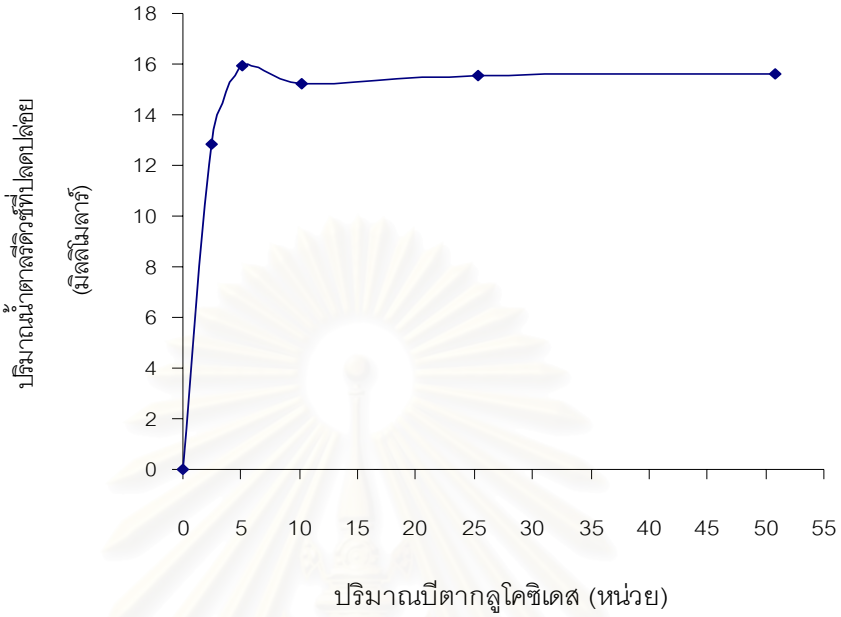
รูปที่ 4.2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส GC220 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสในช่วง 4.0 – 8.0

จากรูปที่ 4.2 พบว่าเซลลูเลส GC220 มีความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 4.0 – 6.5 โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 ดังนั้นในการทดลองต่อไปเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0

4.1.2.3 ผลของปริมาณเซลลูเลส GC220 ในการย่อยชานอ้อย

ปริมาณเซลลูเลส GC220 ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมา เป็นค่าที่สุ่มเลือกขึ้นมาจึงอาจไม่ใช่ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย่อยชานอ้อย จึงศึกษาหาปริมาณของเซลลูเลส GC220 ที่เหมาะสมต่อระบบ โดยนำชานอ้อย 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 มาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 45

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยแปรผันปริมาณเซลลูเลส GC220 ตั้งแต่ 0 2.5 5 10 25 และ 50 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส) ได้ผลดังรูปที่ 4.3

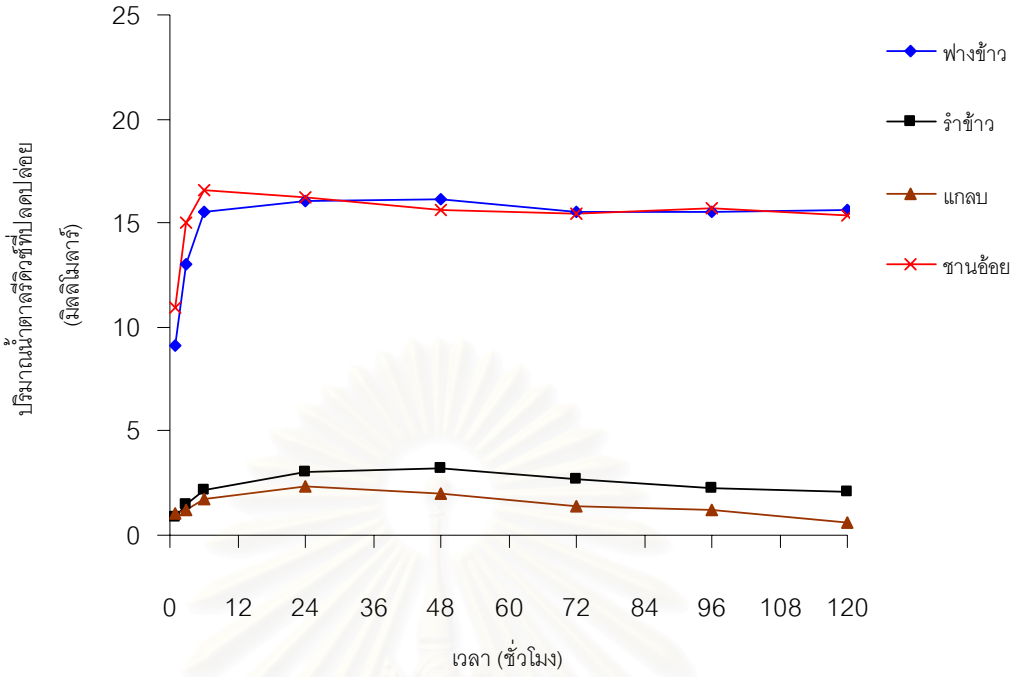


รูปที่ 4.3 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อย ด้วยเซลลูเลส GC220 โดยแปรผันปริมาณเซลลูเลส GC220 ตั้งแต่ 0 – 50 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส)

จากรูปที่ 4.3 พบว่าปริมาณเซลลูเลส GC220 5 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส) สามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด จึงเลือกค่านี้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.1.3 ผลของเวลาที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดด้วยเซลลูเลส GC220

ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ ที่ผ่านการปรับสภาพ ตามวิธีในข้อ 3.5.2.1 ด้วยเซลลูเลส GC220 โดยอุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 ได้ใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อยจากการทดลองที่ผ่านมา เนื่องจากเป็นเอนไซม์จากแหล่งเดียวกัน อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานเอนไซม์ควรเป็นค่าเดียวกัน อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด จึงศึกษาเวลาที่มีเหมาะสมของเซลลูเลส GC220 ต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด ตามวิธีในข้อ 3.5.2.3 ได้ผลดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยเซลลูเลส GC220 5 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อยตั้งแต่ 1 3 6 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.4 พบว่าเวลาที่เหมาะสมของเซลลูเลส GC220 ในการย่อยชานอ้อย คือ 6 ชั่วโมง ส่วนฟางข้าว แกลบ และรำข้าว คือ 24 ชั่วโมง

4.1.4 ผลการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 ตามภาวะที่เหมาะสม

จากผลการทดลองข้อ 4.1.3 ทำให้ทราบเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดด้วยเซลลูเลส GC220 จึงนำชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ มาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ตามวิธีในข้อ 3.5.2.4 เพื่อเตรียมไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร สำหรับใช้ศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเสตของชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ จากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 ด้วยเวลาที่เหมาะสมของวัสดุเหลือใช้แต่ละชนิด

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	เวลาที่ใช้ในการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 (ชั่วโมง)
ชานอ้อย	4.10	6
ฟางข้าว	5.99	24
รำข้าว	0.47	24
แกลบ	0.41	24

จากตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 มีปริมาณค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะแกลบและรำข้าว (0.41 และ 0.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จึงนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก

4.1.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก

จากการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบที่ผ่านการปรับสภาพ มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ตามวิธีในข้อ 3.5.2.5 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดด้วยวิธี DNS (Miller, 1959) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตารางที่ 4.2 ได้ผลดังตารางที่ 4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเสตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรระหว่างการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกและเซลลูเลส GC220

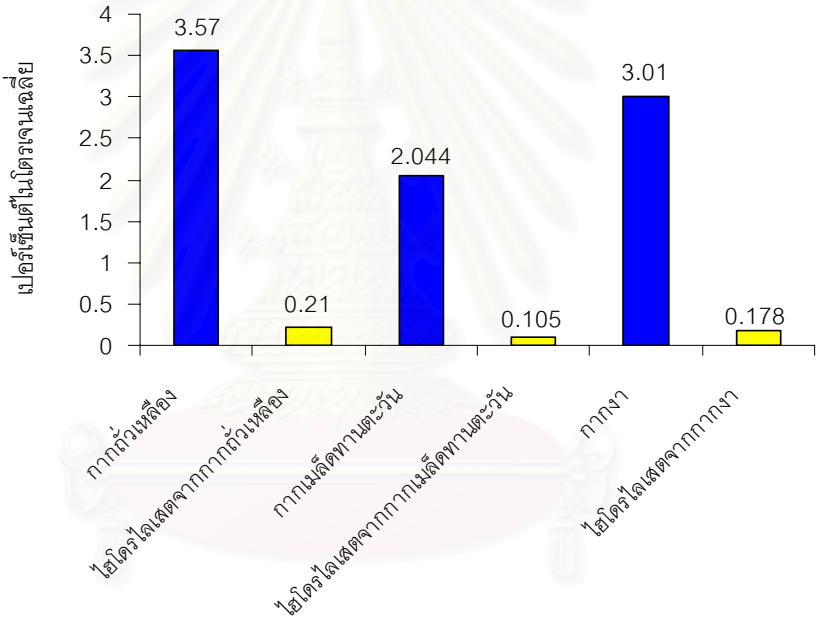
วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเมื่อย่อยด้วยเซลลูเลส GC220
ชานอ้อย	18.71	4.10	21.91
ฟางข้าว	16.66	5.99	35.95
รำข้าว	22.81	0.47	2.06
แกลบ	10.72	0.41	3.82

จากตารางที่ 4.3 พบว่าเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ของแกลบและรำข้าวจากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 มีปริมาณต่ำมาก (3.82 และ 2.06 % ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับชานอ้อยและฟางข้าว (21.91 และ 35.95 % ตามลำดับ) ส่งผลให้แกลบ และรำข้าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย จากนั้นจึงนำไฮโดรไลเสตจากชานอ้อยและฟางข้าวที่ได้จากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ไปทำให้เข้มข้นมากขึ้นด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Lyophilizer) สำหรับนำไปใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เลือกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด อันได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงา มีส่วนประกอบที่เป็นหน่วยย่อยของกรดอะมิโนอยู่มากมายและมีปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องปรับให้ไฮโดรไลเสตจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณธาตุไนโตรเจนอิสระเริ่มต้นเท่ากัน สำหรับนำไปศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย โดยเตรียมไฮโดรไลเสตจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดตามวิธีในข้อ 3.5.3.2 จากนั้นนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสตทั้ง 3 ชนิด มาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl ตามวิธีในข้อ 3.5.3.1 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดโดยวิธี Kjeldahl

จากรูปที่ 4.5 พบว่าปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยจากไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 0.1 – 0.2% โดยปริมาตร โดยไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลืองมีปริมาณไนโตรเจนมากที่สุด (0.210% โดยปริมาตร) ส่วนไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวันมีปริมาณไนโตรเจนต่ำสุด (0.105% โดยปริมาตร) โดยค่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเฉลี่ยที่ได้นำไปใช้คำนวณหาปริมาณไฮโดรเสตที่จะเติมลงในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.3 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

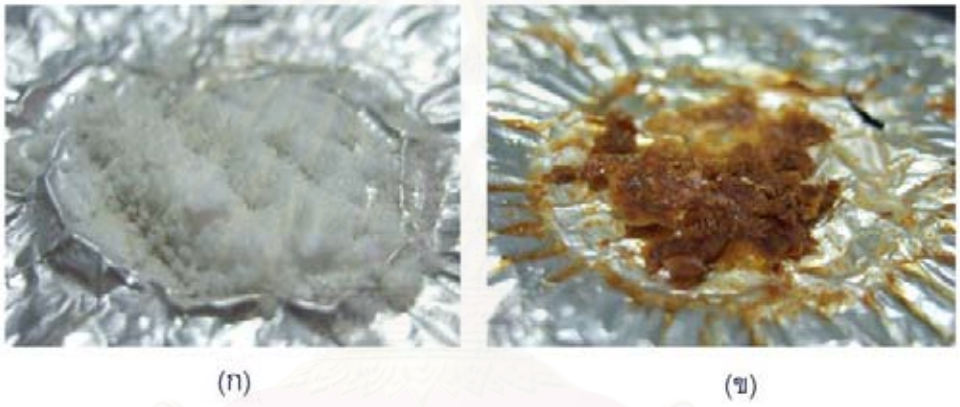
จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 5 ชนิด คือ ซูโครส ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (วิธีเตรียมตามข้อ 3.5.2.6) ไฮโดรไลเสตจากฟางข้าว (วิธีเตรียมตามข้อ 3.5.2.4) ไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย (วิธีเตรียมตามข้อ 3.5.2.4) และกากน้ำตาล โดยปรับให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากัน เพื่อทดแทนซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีในข้อ 3.5.4.3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 อัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณสารตั้งต้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณที่ใช้เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 4% (กรัม)
ซูโครส	4.60	3.86	0.84	4.00
ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง	4.12	1.93	0.47	4.28
ไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย	0	0	0	62.53
ไฮโดรไลเสตจากฟางข้าว	5.19	4.29	0.83	41.72
กากน้ำตาล	2.23	0	0	6.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลจากตารางที่ 4.4 พบว่าไฮโดรไลเสตจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เซลล์มีการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นรองลงมา คือ ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ ส่วนกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์มีการเจริญต่ำและไม่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในขณะที่เมื่อใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้ไม่มีการเจริญของเซลล์และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าไฮโดรไลเสตจากฟางข้าว ต้องใช้ฟางข้าว จำนวน 41.72 กรัม ในขณะที่ซูโครสใช้เพียง 4 กรัม นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไฮโดรไลเสตของฟางข้าว มีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม ไม่เป็นผงละเอียด แตกต่างจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากซูโครสที่มีลักษณะสีขาว เป็นผงละเอียด ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02
(ก) ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (ข) ไฮโดรไลเสตจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความคุ้มทุน ขั้นตอนการเตรียม การนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับขยายส่วน และการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้งาน จะเห็นว่า ไฮโดรไลเสตจากฟางข้าวไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงเลือกใช้ซูโครสเช่นเดิมเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับพอลิแซ็กคาไรด์

เป็นที่ทราบกันกว่า ซูโครสเป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส และฟรักโทส ดังนั้นการที่ซูโครสให้ผลผลิตดีนั้น มาจากซูโครสเองหรือจากส่วนประกอบหลังผ่านกระบวนการไฮโดรไลส์ อันได้แก่ กลูโคส และฟรักโทส จึงทำการทดลองการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส ฟรักโทส และกลูโคสผสมฟรักโทส (ในอัตราส่วน 1 : 1) โดยปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นให้เท่ากัน คือ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
ซูโครส	3.26	3.81	1.17
กลูโคส	3.00	3.29	1.10
ฟรักโทส	3.18	2.85	0.90
กลูโคส + ฟรักโทส (อัตราส่วน 1 : 1)	3.32	3.48	1.05

ผลจากตารางที่ 4.5 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด รองลงมา คือ กลูโคสผสมฟรักโทส (อัตราส่วน 1 : 1) กลูโคส และฟรักโทส ตามลำดับ ส่วนการเจริญของเซลล์สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสผสมฟรักโทส (อัตราส่วน 1 : 1) เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมา คือ ซูโครส ฟรักโทส และกลูโคส ตามลำดับ ดังนั้นทั้งกลูโคสและฟรักโทส มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ถ้าขาดอย่างใดอย่างหนึ่งจะทำให้เซลล์มีการเจริญ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์น้อยลง จึงยืนยันได้ว่า ซูโครสเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป

4.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์แตกต่างกัน ที่ปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเป็น 0.02% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.5.4.4 ได้ผลการทดลอง

ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ล้วนแต่เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทั้งสิ้น ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ไฮโดรไลเสตจากกากงา กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวัน พบว่าไม่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
แอมโมเนียมซัลเฟต	3.46	3.81	1.10
แอมโมเนียมคลอไรด์	3.41	4.01	1.18
แอมโมเนียมไนเตรต	3.81	3.44	0.90
โซเดียมไนเตรต	2.58	1.84	0.71
ไฮโดรไลเสตจากกากงา	3.61	0	0
ไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลือง	3.12	0	0
ไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน	4.16	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด ส่วนไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด จึงได้ทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์กับไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน

อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
100 : 0	3.86	3.78	0.98
75 : 25	4.27	0.06	0.014
50 : 50	4.30	0	0
25 : 75	4.49	0	0
0 : 100	4.50	0	0

จากตารางที่ 4.7 พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน ปริมาณ 25% มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำมาก คือ 0.06 กรัมต่อลิตร และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวันเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ 50% ขึ้นไป พบว่าไม่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นจึงเลือกแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

4.3.3 ผลของวิตามินและเกลือแร่

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.08% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันแหล่งวิตามินและเกลือแร่ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.5 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.8

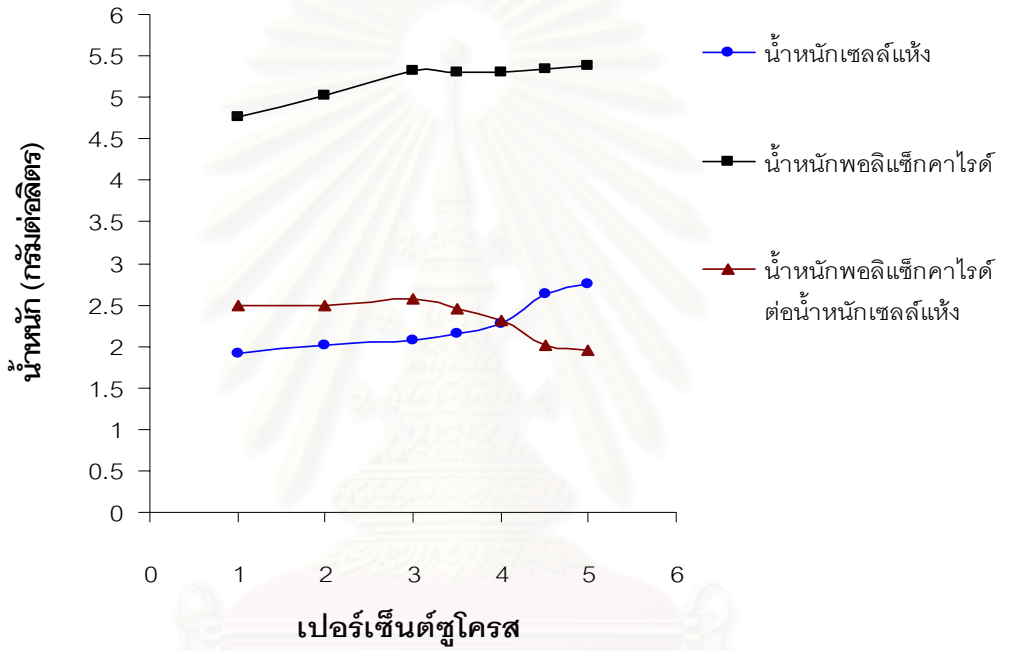
ตารางที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งวิตามินและเกลือแร่

แหล่งวิตามินและเกลือแร่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
แมกนีเซียมซัลเฟต + สารสกัดจากยีสต์	3.11	4.53	1.46
สารสกัดจากยีสต์	2.72	2.44	0.90
แมกนีเซียมซัลเฟต	2.28	4.96	2.18
ไม่ใส่ทั้ง 2 อย่าง	2.52	2.14	0.85

จากตารางที่ 4.8 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียวมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด แต่มีการเจริญของเซลล์ต่ำสุด ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งแมกนีเซียมและสารสกัดจากยีสต์ มีการเจริญของเซลล์สูงสุด รองลงมา คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างเดียว โดยในงานวิจัยมุ่งเน้นการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียให้ได้ปริมาณมาก ดังนั้นจึงเลือกแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

4.3.4 ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.08% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งเกลือแร่ โดยแปรผันความเข้มข้นซูโครส ตั้งแต่ 1.0 – 5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.5.4.6 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.7

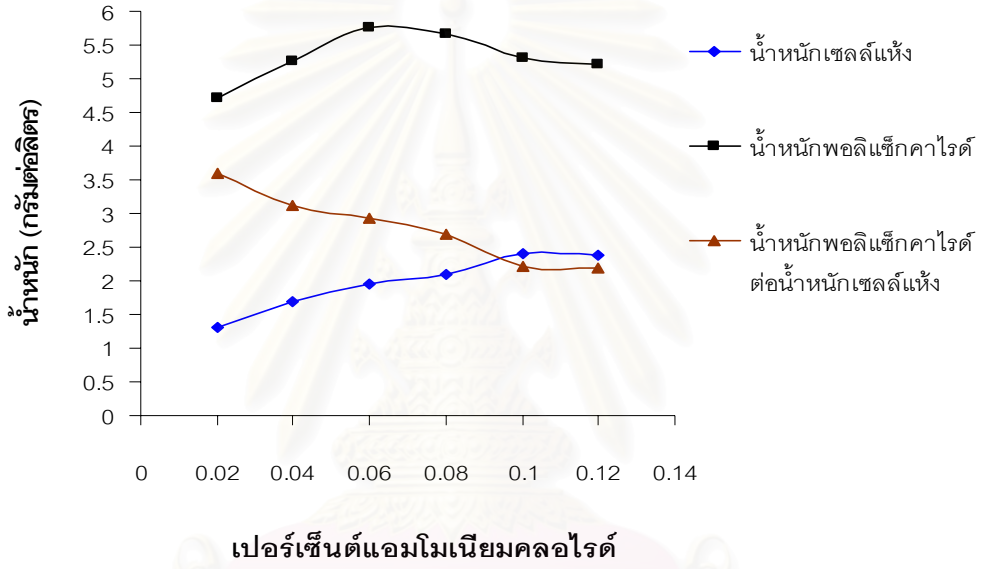


รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นซูโครส 1.0 – 5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารที่มีปริมาณซูโครสตั้งแต่ 3.0 – 5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าค่อนข้างคงที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่วนการเจริญของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่ามากสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณซูโครส 3.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จึงเลือกใช้ค่านี้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

4.3.5 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 3.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งเกลือแร่ โดยแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.02 – 0.12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.5.4.7 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.02 - 0.12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ผลจากรูปที่ 4.8 พบว่าการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ในช่วงความเข้มข้น 0.02 – 0.10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นการเจริญของเซลล์เริ่มคงที่ ส่วนปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.06% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เริ่มลดลงและคงที่ ในช่วงความเข้มข้น 0.08 - 0.12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้สูงสุดที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.06% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จึงเลือกใช้ค่านี้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

จากผลการทดลองข้อ 4.3.1 – 4.3.5 เป็นการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ได้สูตรอาหารดัดแปลงใหม่ดังนี้

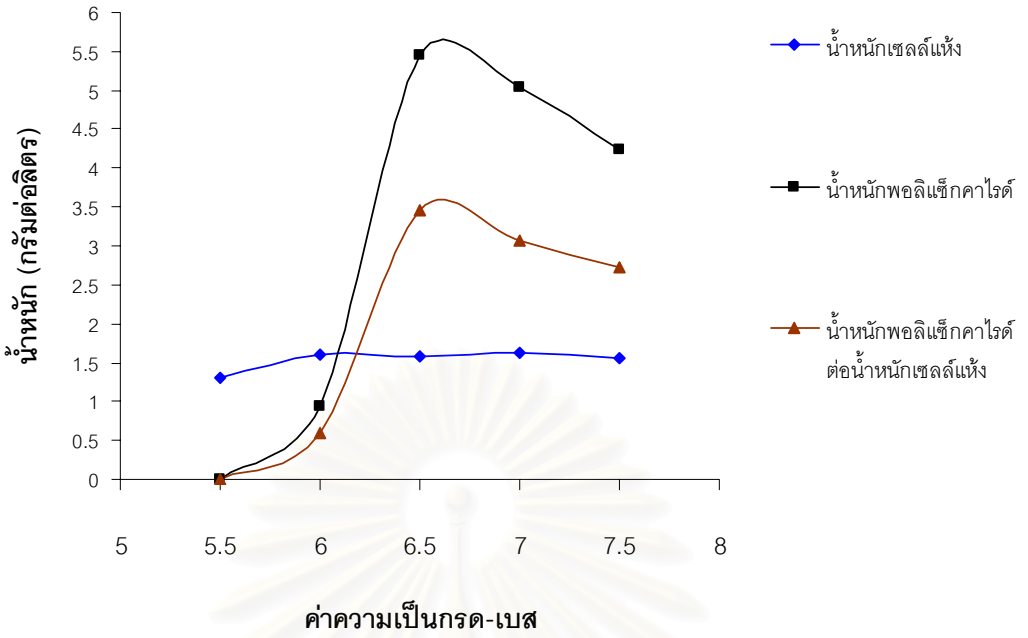
ซูโครส	30	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เพื่อให้สูตรอาหารดัดแปลงใหม่มีประสิทธิภาพดีในการนำไปเลี้ยง *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กไรด์ ในการทดลองต่อไป จึงศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรด-เบส

4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3

4.4.1 ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5.5 – 7.5 (5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ) ตามวิธีในข้อ 3.5.5.1 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียมีค่าสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 ส่วนการเจริญของเซลล์ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 – 7.5 มีค่าใกล้เคียงกัน โดยเซลล์มีการเจริญสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0

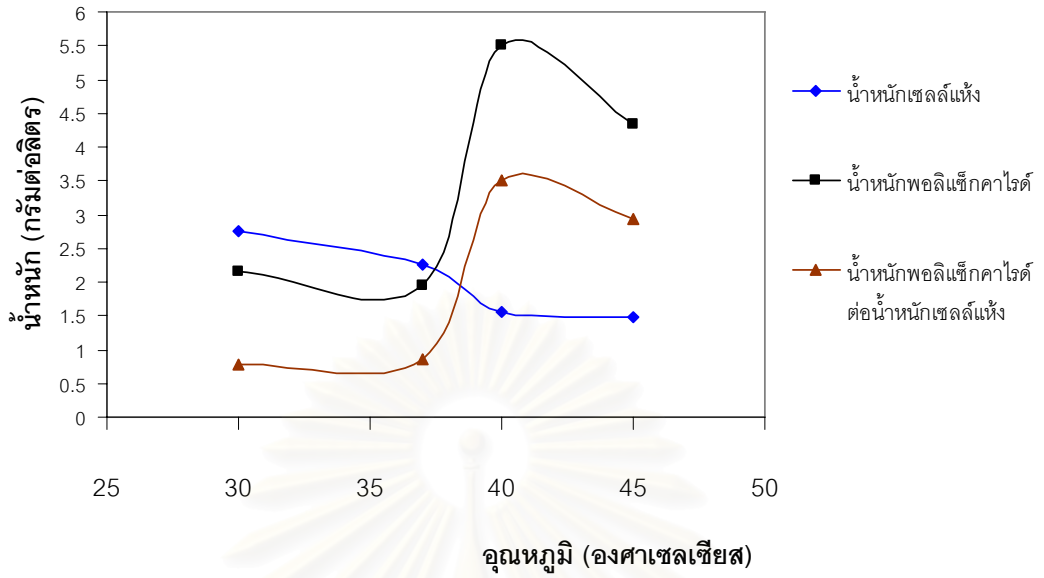


รูปที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.3 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5.5 – 7.5

เมื่อพิจารณาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าสูงสุด จากรูปที่ 4.9 จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-เบสที่ 6.5 เป็นค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป

4.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 30 – 45 องศาเซลเซียส ตามวิธีในข้อ 3.5.5.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าสูงสุด (5.51 กรัมต่อลิตร) เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รองลงมา คือ 45 องศาเซลเซียส (4.35 กรัมต่อลิตร) ส่วนการเจริญของเซลล์จะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อสูงขึ้น โดยเซลล์มีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



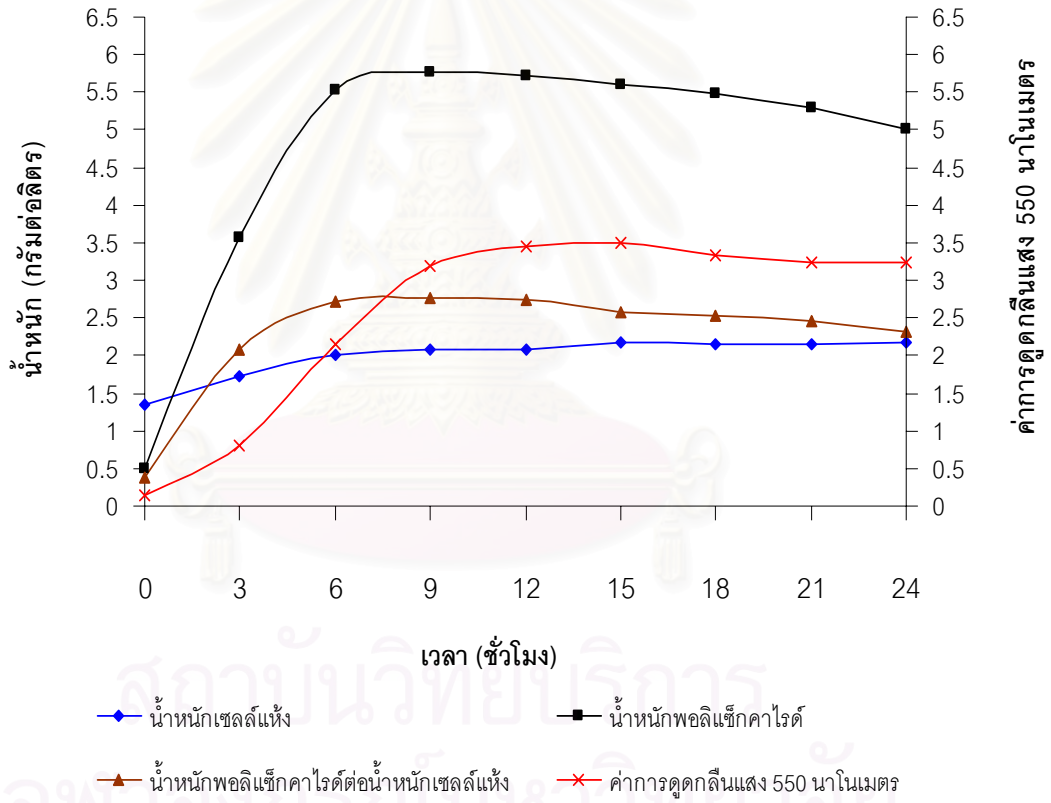
รูปที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่จากข้อ 4.3 โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 30 – 45 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าสูงสุด คือ 5.51 กรัมต่อลิตร และ 3.51 ตามลำดับ จากรูปที่ 4.10 จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้บ่มเชื้อสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

จากผลการทดลองข้อ 4.4.1 และ 4.4.2 เป็นการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 พบว่า*E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5

4.5 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 นำน้ำเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ตามวิธีในข้อ 3.5.4.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.11 พบว่าการเจริญของเซลล์และปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป และเมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญ (primary metabolite) โดยเวลาที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 9 – 12 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่มีปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด

4.6 การเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ระหว่างสูตรอาหารเดิมและสูตรอาหารที่ดัดแปลงใหม่

จากการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก)) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 ตามวิธีในข้อ 3.5.7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 4.10 และรูปที่ 4.12 4.13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

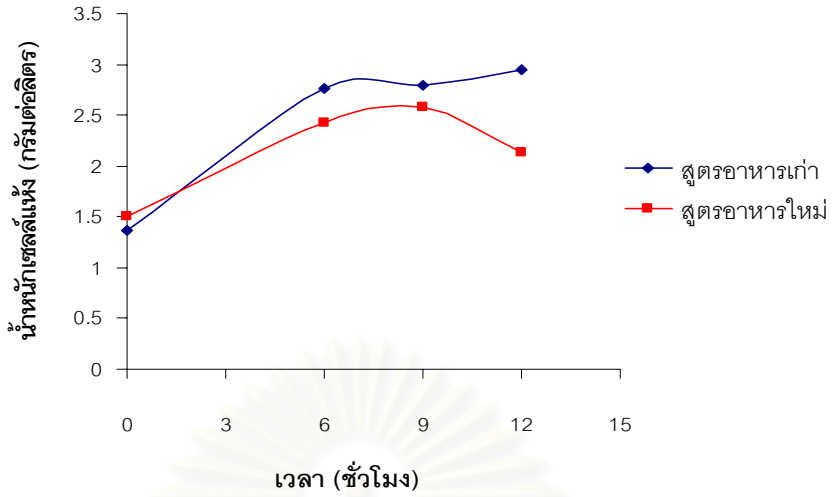
ตารางที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

เวลาที่ใช้บ่ม (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
0	1.37	0	0
6	2.76	4.18	1.51
9	2.80	4.58	1.64
12	2.94	4.57	1.55

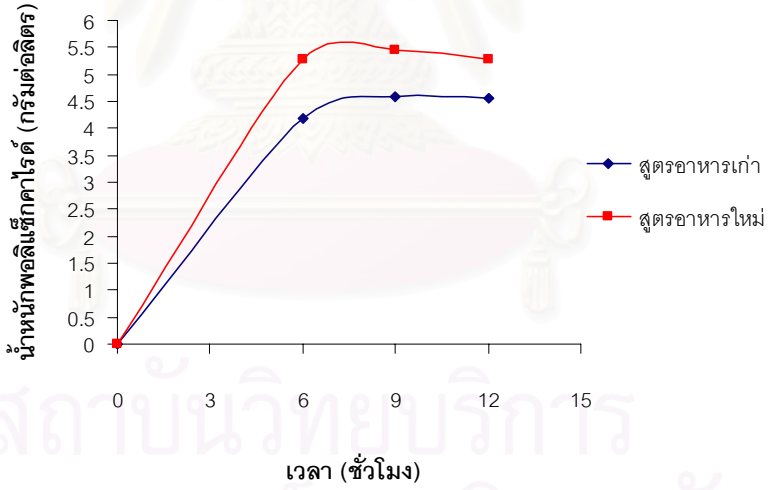
ตารางที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.3)

เวลาที่ใช้บ่ม (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
0	1.50	0	0
6	2.42	5.27	2.18
9	2.58	5.44	2.11
12	2.14	5.29	2.47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) และอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.3)



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) และอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ (จากข้อ 4.3)

จากตารางที่ 4.9 4.10 และรูปที่ 4.12 4.13 พบว่าการเจริญของเซลล์ในสูตรอาหารเดิมสูงกว่าสูตรอาหารดัดแปลงใหม่ ในขณะที่ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารสูตรอาหารดัดแปลงใหม่มีค่ามากกว่าสูตรอาหารเดิม โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร เริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ในชั่วโมงที่ 6 และมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดในชั่วโมงที่ 9

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้สูงสุดระหว่างสูตรอาหารเดิม (4.58 กรัมต่อลิตร) และสูตรอาหารดัดแปลงใหม่ (5.44 กรัมต่อลิตร) พบว่าเปอร์เซ็นต์การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่เพิ่มขึ้น 18.78% จากอาหารสูตรเดิม และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์ที่มีราคาแพง และใช้ปริมาณซูโครสน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ จากข้อ 4.3 จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียในระดับขยายส่วนต่อไป อย่างไรก็ตาม เพื่อให้การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสูตรอาหารดัดแปลงใหม่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการทดลองต่อไปจึงศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่

4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. Cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่

จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียมีปริมาณสูงสุด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน จึงทำการทดลองเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ ตามวิธีในข้อ 3.5.8 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 และอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ

แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิที่ใช้บ่ม (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
แอมโมเนียมคลอไรด์	40	2.26	4.2	1.86
แอมโมเนียมคลอไรด์	30 (ชั่วโมงที่ 0-6) 40 (ชั่วโมงที่ 6-12)	2.12	4.86	2.29
กากเมล็ดทานตะวัน	40	2.42	0	0
กากเมล็ดทานตะวัน	30 (ชั่วโมงที่ 0-6) 40 (ชั่วโมงที่ 6-12)	2.54	0	0
กากเมล็ดทานตะวัน (ชั่วโมงที่ 0-6) เติม แอมโมเนียมคลอไรด์ (ชั่วโมงที่ 6-12)	30	2.78	0	0
กากเมล็ดทานตะวัน (ชั่วโมงที่ 0-6) เติม แอมโมเนียมคลอไรด์ (ชั่วโมงที่ 6-12)	40	2.48	0	0
กากเมล็ดทานตะวัน (ชั่วโมงที่ 0-6) เติม แอมโมเนียมคลอไรด์ (ชั่วโมงที่ 6-12)	30 (ชั่วโมงที่ 0-6) 40 (ชั่วโมงที่ 6-12)	2.30	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4.11 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นอาหารที่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ คือ 4.2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิระหว่างการบ่มเชื้อจาก 30 องศาเซลเซียสใน 6 ชั่วโมงแรก เป็น 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ คือ 4.86 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นการเปลี่ยนอุณหภูมิระหว่างการบ่มเชื้อจาก 30 องศาเซลเซียสใน 6 ชั่วโมงแรก เป็น 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา ทำให้ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย ในสูตรอาหารดัดแปลงใหม่มีค่าเพิ่มขึ้น โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 15.71%

จากผลการทดลองที่ผ่านมา สามารถสรุปสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณมาก ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 สรุปสูตรอาหารดัดแปลงใหม่และภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

สูตรอาหาร	% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	ภาวะที่เหมาะสม		
		อุณหภูมิที่บ่ม (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรด-เบส	เวลา (ชั่วโมง)
Sucrose	3			
NH_4Cl	0.06	30 (ชั่วโมงที่ 0-6)		
$MgSO_4.7H_20$	0.02	40 (ชั่วโมงที่ 6 – 12)	6.5	12
K_2HPO_4	0.9			
KH_2PO_4	0.3			

4.8 สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

4.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ ปริมาณ100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ประกอบด้วยโปรตีน 0.0234 กรัมต่อลิตร หรือ 0.234%

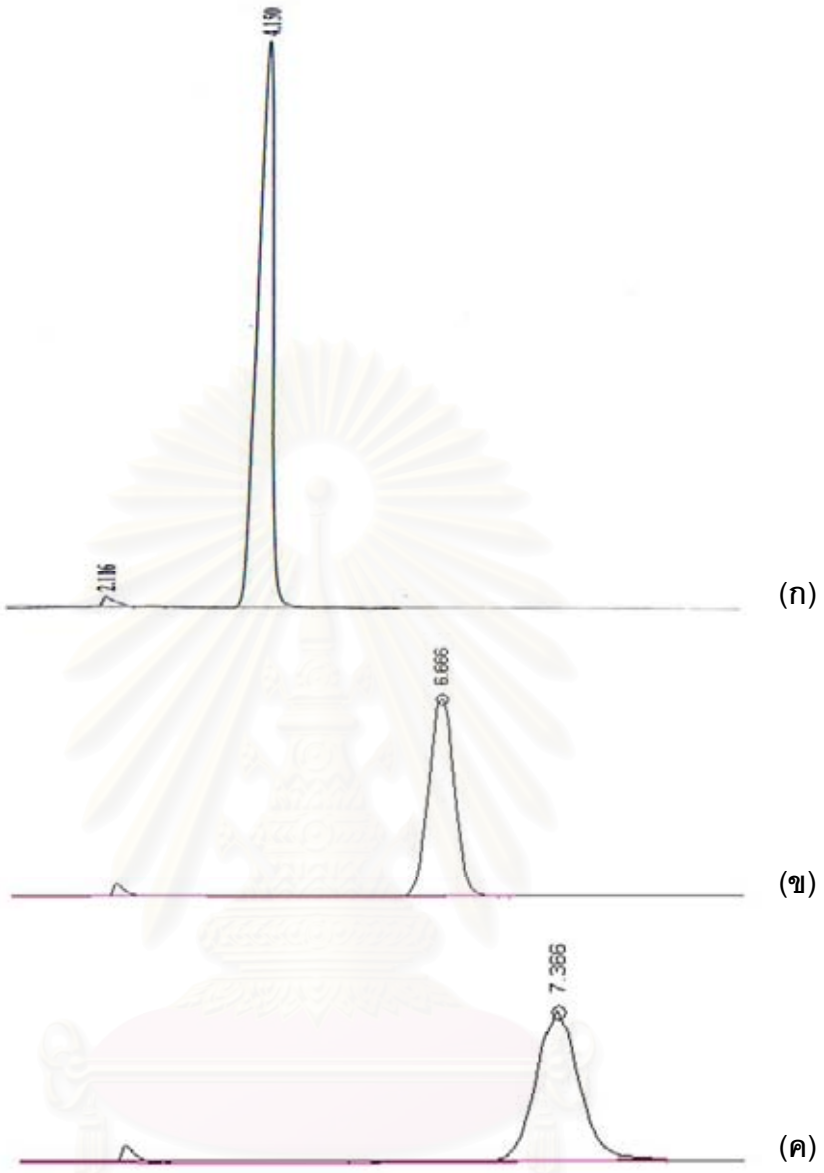
4.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ตามวิธีในข้อ 3.5.9.2.1 จากนั้นตรวจสอบปริมาณกลูโคสด้วยเครื่องวิเคราะห์กลูโคส พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสในผลิตภัณฑ์ปริมาณ 0.118 กรัมต่อลิตร

4.8.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดซัลฟูริก ตามวิธีในข้อ 3.5.9.2.1 จากนั้นตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโทกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.5.9.2.2 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.14 4.15 และ 4.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

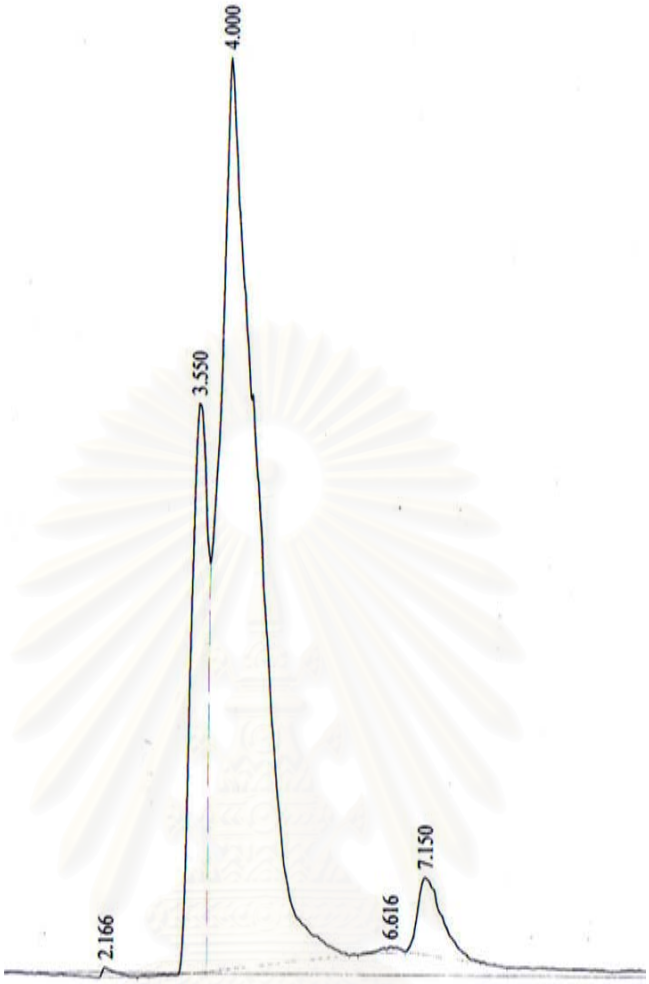


รูปที่ 4.14 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (ไซโลส กลูโคส และกาแลกโทส) โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 85% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

(ก) สารมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

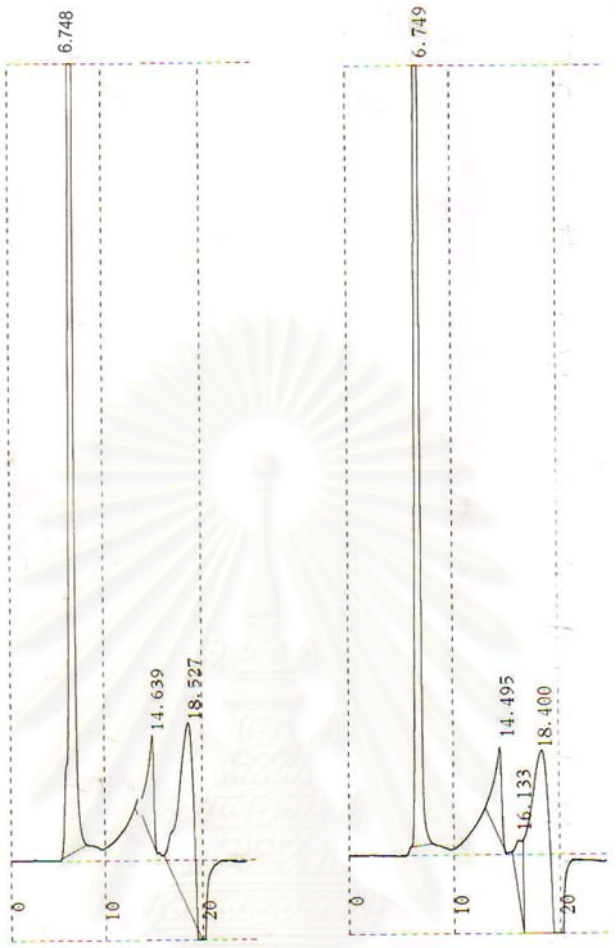
(ข) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

(ค) สารมาตรฐานน้ำตาลกาแลกโทส



รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ 85% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.14 และ 4.15 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ ประกอบด้วย น้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตัวอื่นที่อาจจะเป็นน้ำตาลกาแลกโทส เพียงเล็กน้อย



(ก) (ข)

รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้น้ำกลั่นปลอดประจุเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

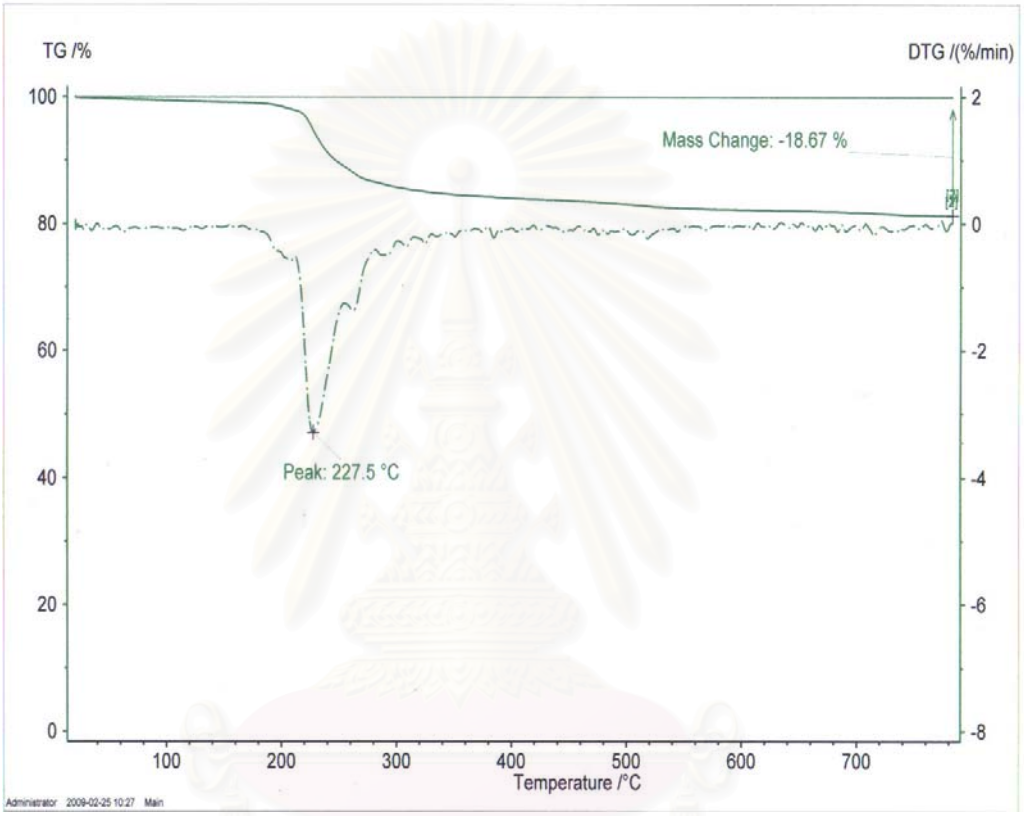
(ก) พอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่

(ข) พอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม

จากรูปที่ 4.16 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่มีองค์ประกอบของน้ำตาลเหมือนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998))

4.8.4 การวิเคราะห์การหลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ มาวิเคราะห์การหลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.5.9.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่หลอมเหลวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. cloacae*

จากรูปที่ 4.17 พบว่าอุณหภูมิที่หลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 227.5 องศาเซลเซียส โดยมีขั้นตอนกระบวนการสลาย (decomposition stage) 1 ขั้นตอน และพอลิแซ็กคาไรด์เริ่มมีน้ำหนักลดลงที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 227.5 – 280 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์เริ่มคงที่ตั้งแต่อุณหภูมิ 300 – 800 องศาเซลเซียส โดยเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ตลอดกระบวนการ มีค่าเท่ากับ 18.67%

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ สิ่งที่ควรคำนึงถึง คือ ต้นทุนในการผลิต และประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียให้ได้ปริมาณมาก แต่ใช้ต้นทุนต่ำ และสมบัติเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

งานวิจัยนี้ได้เลือกชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ มาใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้จัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสิก มีส่วนประกอบหลักได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และภาวะที่เจริญเติบโต (ชมพูนุช หาญนันทวิวัฒน์, 2547) จึงนำมาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้มาย่อยด้วยเซลลูเลส และเนื่องจากเซลลูโลสที่พบในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมักไม่อยู่ในรูปอิสระ และมีโครงสร้างที่ยากต่อการเข้าถึงสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ (Dekker และ Wallis, 1983; Woodward, 1987; Pirisi, 1989) ดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 จึงต้องปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ เพื่อให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมสำหรับการย่อยด้วยเซลลูเลส ตามวิธีของ สุภาพร ชาติวรพงศา (2536)

ผลการศึกษาแอกทิวิตีของเซลลูเลส GC220 ตามวิธีของ Ghose (1987) และ Sternberg และคณะ (1977) พบว่าเซลลูเลส GC220 มีแอกทิวิตีของบีตากลูโคซิเดส (507.59 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร) เด่นกว่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส (149.65 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยของจารุวรรณ สัมพันธ์วณิช (2548) ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส GC220 พบว่าอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเซลลูเลส GC220 สอดคล้องกับเอกสารประกอบการใช้เซลลูเลส GC220 ของบริษัท Genencor, Finland และผลการศึกษาปริมาณของเซลลูเลส GC220 ที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อย พบว่าปริมาณเซลลูเลส GC220 5 หน่วยเอนไซม์ (บีตากลูโคซิเดส) สามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด โดยที่ปริมาณ

มากกว่านี้จะไม่เพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ได้แก่ เซลโลไบโอส และกลูโคส จะยับยั้งการทำงานของเซลลูเลส GC220 เอง (Bailey และ Ollis, 1986) Xiao และคณะ (2004) รายงานว่า การศึกษาผลกระทบของการยับยั้งของกลูโคสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น ๆ ที่มีต่อเซลลูเลสและบีตากลูโคซิเดส พบว่าเมื่อปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การยับยั้งแอกทิวิตีของเซลลูเลสและบีตากลูโคซิเดสเพิ่มตาม ในขณะที่แมนโนส ไซโลส และกาแลกโทส ไม่มีผลยับยั้งแอกทิวิตีของบีตากลูโคซิเดส แต่มีผลต่อแอกทิวิตีของเซลลูเลส

ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 ในระบบที่มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 พบว่าเวลาที่เหมาะสมของเซลลูเลส GC220 ในการย่อยชานอ้อย คือ 6 ชั่วโมง ส่วนฟางข้าว แกลบ และรำข้าว คือ 24 ชั่วโมง โดยเวลาที่ใช้ย่อยมากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยไม่ได้เพิ่มขึ้นตาม และพบว่าเวลาที่ใช้น้อยกว่าข้อมูลงานวิจัยของ จารุวรรณ สัมพันธ์วณิช (2548) รายงานว่า เวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อย ซังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว ด้วยเซลลูเลส Cyto®CL และ GC220 คือ 48 ชั่วโมง ในระบบที่มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-เบส 4.5

ผลการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC 220 ตามภาวะที่เหมาะสม พบว่าเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ของแกลบและรำข้าวจากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 มีปริมาณต่ำมาก (3.82 และ 2.06% ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับชานอ้อยและฟางข้าว (21.91 และ 35.95% ตามลำดับ) การที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยของแกลบเมื่อย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 มีค่าต่ำมาก อาจมีสาเหตุมาจากโครงสร้างภายในของแกลบ ที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จำพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ ที่มีซิลิกา (SiO_2) เป็นองค์ประกอบหลัก (www.mtec.or.th) โดยซิลิกาอาจมีผลยังยั้งการทำงานของเซลลูเลส GC220 ส่วนกรณีของรำข้าว อาจมีสาเหตุจากมีปริมาณเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบต่ำ ทำให้เมื่อนำมาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 จึงปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาเพียงเล็กน้อย เนริสา คุณประทุม (2543) รายงานว่า รำข้าวเจ้าประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณ 8.30 17.58 และ 2.38 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนชานอ้อย ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณ 34.08 20.31 และ 8.93 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากรายงาน เห็นได้ว่าปริมาณเซลลูโลสในรำข้าวน้อยกว่าชานอ้อยถึง 4.11 เท่า และเมื่อพิจารณาถึงค่าใช้จ่าย และ

เวลาที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร จะเห็นว่าแกลบและรำข้าวเป็นวัตถุดิบที่ไม่สมควรจะนำมาใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นอย่างมาก จึงได้ตัดแกลบและรำข้าวทิ้ง และเลือกใช้ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังและกากน้ำตาลแทน สำหรับการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนในขั้นต่อไป เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก ส่วนกากน้ำตาลเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลที่มีคุณค่าทางอาหารสูง

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย คือ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 คัดแยกได้จากอ้อย โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในรายงาน คือ อาหารเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) จึงใช้สูตรอาหารนี้เป็นสูตรเริ่มต้นในการปรับปรุง เริ่มตั้งแต่คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน แหล่งวิตามินและเกลือแร่ ปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม

วัตถุดิบที่ใช้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง ไฮโดรไลเสตจากฟางข้าว ไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย และกากน้ำตาล เพื่อทดแทนซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) พบว่าไฮโดรไลเสตจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เซลล์มีการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด รองลงมา คือ ซูโครส แต่เมื่อพิจารณาขั้นตอนการเตรียมไฮโดรไลเสต ที่ต้องมีการปรับสภาพฟางข้าวก่อน ด้วยเบสและความร้อนสูง จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และต้องใช้ฟางข้าวถึง 41.72 กรัม เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไฮโดรไลเสตของฟางข้าว มีลักษณะสีน้ำตาลเข้มและเป็นก้อน แตกต่างจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากซูโครสที่มีลักษณะสีขาว เป็นผงละเอียด ดังนั้นในแง่ของความคุ้มทุน และคุณภาพผลผลิต พบว่าซูโครสมีความเหมาะสมมากกว่าฟางข้าว ส่วนการที่กากน้ำตาลและไฮโดรไลเสตจากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์มีการเจริญต่ำและไม่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ อาจมีสาเหตุมาจากวัตถุดิบทั้งสองมีการปนเปื้อนของโลหะหนักและสารเคมี (Boonrod และคณะ, 2005) ที่ส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย และจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีซูโครส กลูโคส ฟรักโทส และกลูโคสผสมฟรักโทส (อัตราส่วน 1:1) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด รองลงมา คือ กลูโคสผสมฟรักโทส (อัตราส่วน 1:1) กลูโคส และฟรักโทส ตามลำดับ ดังนั้น การที่ซูโครสสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณมาก เป็นผลจากแบคทีเรียต้องการทั้งกลูโคสและฟรักโทสในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ถ้าขาดอย่างใดอย่างหนึ่งจะ

ทำให้เซลล์ผลิตได้น้อยลง ในการทดลองต่อไป จึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ Manca de Nadra และ Strasser de Saad (1995) รายงานว่า *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จากไวน์ สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้จากน้ำตาลหลายชนิด คือ กลูโคส ฟรักโทส และซูโครส แต่ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากน้ำตาลซูโครสจะสูงที่สุด

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยวัตถุดิบที่ใช้ ประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลือง ไฮโดรไลเสตจากกากทานตะวัน และไฮโดรไลเสตจากกากงา โดยปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากัน คือ 0.02% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เท่านั้น โดยแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 4.01 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการศึกษาขั้นต่อไป Novax และคณะ (1992) รายงานว่า *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน Moreno และคณะ (1998) รายงานว่า *Xanthomonas campestris* สามารถผลิตแซนแทนได้ดี ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลของแหล่งวิตามินและเกลือแร่ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียวมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 4.96 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารที่มีทั้งแมกนีเซียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์ (4.53 กรัมต่อลิตร) เป็นที่ทราบกันว่า สารสกัดจากยีสต์มีราคาแพง ดังนั้นการที่ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณมาก ในอาหารที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตเป็นอย่างดี ในการศึกษาต่อไป จึงเลือกแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งเกลือแร่เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ Prasertsan และคณะ (2008) รายงานว่า *E. cloacae* WD7 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

การแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 1.0 – 5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าค่อนข้างคงที่ ในช่วงความเข้มข้นซูโครส 3.0 – 5.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยอัตราส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่ามากสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณซูโครส 3.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยของ

Prasertsan และคณะ (2008) รายงานว่า ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. cloacae* WD7 คือ 3.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Stredansky และ Conti (1999) รายงานว่า ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *Agrobacterium tumefaciens* คือ 2.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Sutherland (1977) รายงานว่า น้ำหนักโมเลกุลของ EPS ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ โดยฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่ผลิตจากซูโครส และมีสมบัติทางเคมีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของอาหาร ระยะเวลาในการเจริญ ความเข้มข้นของซูโครส และการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดสายพอลิแซ็กคาไรด์

การแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0.02 – 0.12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นตาม ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.06% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เริ่มลดลงและคงที่ ในช่วงความเข้มข้น 0.08 - 0.12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.06% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Lo และคณะ (1996) รายงานว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่มากเกินไป จะส่งผลให้การผลิตแซนแทนลดลง BeMiller and Whistler (1996) รายงานว่า สารอาหารไนโตรเจนสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ถ้าปริมาณของไนโตรเจนในอาหารมากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์

การศึกษาภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-เบส 6.5 เป็นภาวะที่ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด ส่วนการเจริญของเซลล์มีค่าสูงสุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-เบส 7.0 สอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยของสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) Prasertsan และคณะ (2008) รายงานว่า *E. cloacae* WD7 สามารถเจริญได้ดีและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณมากที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลง 50% ทุก ๆ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 5 องศาเซลเซียส Pace (1981) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-เบสมีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเจริญของเซลล์ Lawson และ Sutherland (1978) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ อยู่ในช่วง 6.0 – 7.5 และอุณหภูมิที่บ่มเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในทางการค้า ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโซไฟล์ (mesophile) Keith และคณะ (1991)

รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-เบส 7.2 เป็นค่าที่เหมาะสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. herbicola* Grobben และคณะ (1995) รายงานว่า *Lactobacillus delbrueckckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิสูงจะมีการผลิต EPS สูงขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 47 องศาเซลเซียส เชื้อจะสูญเสียความสามารถในการผลิต EPS

รูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่ที่มีซูโครส 3.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.06% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งเกลือแร่ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์เป็นเมแทบอไลต์ที่ถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญ (primary metabolite) โดยมีรูปแบบการเจริญในระยะเริ่มต้นที่ค่อนข้างสั้น และเข้าสู่ภาวะคงที่ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อบ่มต่อไปจนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเวลาที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 9 – 12 ชั่วโมง Prasertsan และคณะ (2008) รายงานว่า รูปแบบการเจริญของ *E. cloacae* WD7 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเจริญอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก และผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด (2.23 กรัมต่อลิตร) ในชั่วโมงที่ 72 เป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญคงที่ (stationary phase)

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดย *E. Cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิระหว่างการบ่มเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณมากที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการเปลี่ยนอุณหภูมิระหว่างการบ่มเชื้อจาก 30 องศาเซลเซียสใน 6 ชั่วโมงแรก เป็น 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา ทำให้ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลงใหม่มีค่าเพิ่มขึ้น จาก 4.2 เป็น 4.86 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 15.71% จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการผลิต EPS ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสูงขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณมาก และที่อุณหภูมิต่ำ (Sutherland, 1977; Souw and Demain, 1979; Shu and Yang, 1990) อย่างไรก็ตาม สำหรับแบคทีเรียบางชนิด ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละสายพันธุ์อาจแตกต่างกันไป บางสายพันธุ์อาจจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ดีที่ภาวะที่ไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Sutherland, 1979; Cerning, 1990)

สมบัติเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *E. Cloacae* สายพันธุ์ EN02 จากอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ พบว่าประกอบด้วยโปรตีน 0.234% และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวประกอบด้วยไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตัวอื่นที่อาจจะเป็นกาแลกโทสเพียงเล็กน้อย และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงใหม่มีองค์ประกอบของน้ำตาลเหมือนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) โดยอุณหภูมิที่หลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 227.5 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ จึงสรุปได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ (acidic heteropolysaccharide) Prasertsan และคณะ (2006) รายงานว่า EPS ที่ผลิตโดย *E. cloacae* WD7 เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ ประกอบด้วยน้ำตาลที่มีประจุเป็นกลาง 29.4% กรดยูโรนิก 14.2% และน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน 0.93% Tekada และคณะ (1994) รายงานว่า จากการคัดแยกเชื้อจากใบไม้พบ *Enterobater* sp. ที่สามารถผลิต EPS ได้ และเมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ พบว่าประกอบด้วยกลูโคส แมนโนส แรมโนส กาแลกโทยูโรนิก แอซิด และ กลูคลูโรนิก แอซิด และพบว่าไม่มีรายงานการผลิตฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ จากแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ Cerning และคณะ (1990) รายงานว่า EPS ส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และกาแลกโทส

สรุปผลการทดลอง

1. สูตรอาหารดัดแปลงใหม่สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วย ซูโครส แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 3.0 0.06 0.02 0.9 และ 0.3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 30 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงแรก และ 40 องศาเซลเซียส ใน 6 ชั่วโมงต่อมา

3. ค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4. ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสูตรอาหารดัดแปลงใหม่สูงกว่าอาหารสูตรเดิม (อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 18.78% และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสูตรอาหารดัดแปลงใหม่ คือ 4.86 กรัมต่อลิตร

5. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *E. cloacae* สายพันธุ์ EN02 เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตัวอื่นเพียงเล็กน้อย อุณหภูมิที่หลอมเหลวของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 227.5 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จารุวรรณ สัมพันธ์วณิช. 2548. การคัดเลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จันทร์จนา ตันสกุล. 2539. การคัดเลือกเชื้อและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชมพูนุช หาญนันทวิวัฒน์. 2547. การผลิตน้ำตาลจากการย่อยสลายโมเลกุลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับกรดซัลฟูริก วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เนริสา คุณประทุม. 2543. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พันทิพา โพธิ์วัน. 2547. การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์. 2551. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อังคณา พันธ์ศรี. 2541. ผลของออกซิเจนและสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Andaloussi, S. A., Talbaoui, H., Marczak, R. and Bonaly, R. 1995. Isolation and characterization of extracellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum*. Apply Microbiology Biotechnology. 43:995-1000.

Antti, H. T., Ulla, A., Robert, von W., Heikki, O., Juhani, K. and Matti, L. 1999. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. Applied Environmental Microbiology. 65(2):862-864.

Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M, R., Tallon, R., Quesada, E. and Bejar, V. 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. Extremophiles. 7:319-326.

Asai, T. 1968. Acetic Acid Bacteria Classification and Biochemistry Activities. Tokyo: Tokyo Press.

Atkinson, B. and Mavituna, F.1983. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. New York :The Nature Press.

Ayala-Hernandez, I., Hassan, A., Goff, H, D., Mira de Orduna, R. and Corredig, M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. International Dairy Journal. 18:1109-1118

Bailey, J. E. and Ollis, D. F. 1986. Hydrolysis of starch and cellulose. *In* Biochemical Engineering Fundamentals, pp. 163-172. New York: McGraw –Hill.

Banik, R. M., Santhiagu, A. and Upadhyay. 2007. Optimization of nutrients for gellan gum production *by Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. Bioresource Technology. 98:792-797.

Behravan, J., Bazzaz, B. S. F. and Salimi, Z. 2003. Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. Biotechnology Apply Biochemistry. 38:267-269.

BeMiller, J. N. and Whistler, R. L. 1996. Carbohydrate. *In* O. R. Fennema (ed.), Food Chemistry, pp. 157-223, 3rd. New York: Marcel Dekker.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic system. Trends in Biotechnology. 3(11):286-290.

Boonrod, S., Rungrawee, Y., Virach, M., Veerawan, P., Bhattacharya, S. C. and Salam, P. A. 2005. Assessment of sustainable energy potential of non-plantation biomass resources in Thailand. Biomass and Bioenergy. 29:214–224.

Bromfield, S. M. 1954. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. General Microbiology. 11:1-6.

Brown, R. M. 2002. Microbial cellulose : A new resource for wood, paper, textiles, food, and specialty products. [online]. http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html. [February 20, 2009]

Bueno, S. M. and Garcia-Cruz, C. H. 2006. Optimization of polysaccharides production by bacteria isolated from soil. Brazilian Journal of Microbiology. 37:296-301.

Celik, G. Y., Aslim, B. and Beyatli, Y. 2008. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. Carbohydrate Polymers. 73:178–182

Cerning, J., Bouillanne, C., Dermazeaud, M. J. and Landon, M. 1986. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnology Letter. 8:625-628.

Cerning, J., Bouillanne, C., Dermazeaud, M. J. and Landon, M. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnology Letter 10: 255-260.

Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review. 97:113-130.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, J. M. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from the slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. Journal dairy science 75: 692-699.

Cerning, J., Renard, C. M., Thibault, J. F., Bduillanna, C., Landon, M. and Desmazeaud, M. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by

Lactobacillus casei CG11 and partial structure analysis of the polymer. Applied and environmental microbiology, 60(11): 3914-3919.

Chao, Y., Ishida, T., Suano, Y. and Shoda, M. 2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in 50L internal loop airlift reactor. Biotechnology and Bioengineering 68(3):345-352.

Coffey, D. G. and Bell, D. A. 1995. Cellulose and cellulose derivative. *In* Food Polysaccharide and their application. New York: Dekker.

Crescenzi, V. 1995. Microbial polysaccharides of applied interest : Ongoing research activities in Europe. Biotechnology Progess. 1:251-259.

Davis, L., Jeon, Y. J., Svenson, C., Rogers, P., Perce, J. and Peiris, P. 2005. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zygomonas mobilis*. Biomass Bioenergy. 29:49-59.

de Belder, A. N. 2003. Dextran. *In* Handbook from Amersham Biosciences, Edition AA. Sweden: Amersham Biosciences AB.

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

DeMan, J. M. 1990. Principle of food chemistry. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

Doubier, J. L. and Llamas, G. 1991. Flow and viscoelastic properties of mixed xanthan gum and galactomannan systems. *In* E. Dickinson (ed.), Food Polymers, Gels and Colloids, pp.349-359. Cambridge:The Royal Society of Chemistry.

Dumitrice, S. 1996. Polysaccharides in medical applications. New York: Marcel Dekker.

Dwivedi, C. P. and Ghose, T. K. 1979. A model on hydrolysis of bagasse cellulose by enzyme from *Tricoderma reesei* Qm 9414. Fermentation Technology. 57(1):15-24.

Forabosco, A., Bruno, G., Sparapano, L., Liut, G., Marino, D. and Delben, F. 2006. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*-I. Production and characterization of exopolysaccharides. Carbohydrate Polymers. 63:535-544.

Fukui, K., Moriyama, T., Miyake, Y., Mizutani, K. and Tanaka, O. 1982. Purification and properties of glucosyltranferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*. Infection and Immunity. 37(1):1-9.

Gaman, P. M. and Sherrington, K. B. 1990. The Science of Food. 3rd ed. Oxford: Pergamon Press.

Garcia, M., Garibay, M. and Marshall, V. M. E. 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Journal apply bacteriology. 70:325-328.

Germaine, G. R., Chludzinski, A. M. ans Schachtele, C. F. 1974. *Streptococcus mutans* dextransucrase: requirement for primer dextran. Journal Bacteriology. 120(1):287-294.

Geronimos, G. L., and Greenfield, P. F. 1978. Viscosity increase in concentrated sugar solutions and molasses due to dextrans. *In* Proceedings of the Queenland Society of Sugar Cane Technologist, 45th Conference, pp. 119-126. Australia: Watson Ferguson.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulose activities (Recommendations of Commission of Biotechnology IUPAC). Pure Apply Chemistry. 59:257-268.

Gokoyr, J. and Eriken, I. 1986. Cellulase : Microbial Enzyme and Bioconversion. *In* V. S. Rose (ed.), Economic Microbiology. London: Academic Press.

Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J. and de Bont, J. A. M. 1995. Production of extracellular polysaccharide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 growth in chemical defined medium. Journal Apply Bacteriology. 79:103-107.

James, G. P. and Cameron, J. M. 1971. The influence of deteriorated can on raw sugar filterability. *In* Proceedings of the Queenland Society of Sugar Cane Technologist, 45th Conference, pp. 247-250. Australia: Watson Ferguson.

Jia, S., Yu, H., Lin, Y. and Dai, Y. 2007. Characterization of extracellular polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* cells in liquid suspension culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12:271-275.

Karthikeyan, R. S., Rakshit, S. K. and Baradarajan, A. 1996. Optimization of batch fermentation conditions for dextrans production. Bioprocess Biosystem Engineering. 15(5):247-251.

Keith, J., Wily, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D. and Mayer, J. 1991. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. Biotechnology and Bioengineering 38:557–560.

Kelsey, R. G. and Shafizadeh, F. 1980. Enhancement of cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis by simultaneous wet milling. Biotechnology and Bioengineering. 22:1025-1036.

Kim, D., Thomas, S. and Fogler, H. S. 2000. Effect of pH and trace minerals of long-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. Applied Environmental Microbiology. 66(3):976-981.

Kim, D., Robyt, J. F., Lee, S., Lee, J. and Kim, Y. M. 2003. Dextran molecular size and degree of brancing as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. Carbohydrate Research. 338:1183-1189.

Kirk, K. T. 1983. Degradation and conversion of lignocelluloses. *In* J. E. Smith, D. R. Berry, and B. Kristiansen (ed.), The Filamentous Fungi. Edward Arnold Publishers.

Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconceili, P., Ceming, J. and Topisiiovic, L. 1992. Analysis of exopolysaccharide production *by Lactobacillus casei* CGII, isolated from cheese. Applied Environmental Microbiology. 58:4086-4088.

Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. and Yamada, Y. 1998. The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose : The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidan* subsp. *nov*. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 62(1):185-187.

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

Lawson, C. J. and Sutherland, I. W. 1978. Polysaccharide. *In* A. H. Rose (ed.), Economic microbiology : Primary products of metabolism, pp. 328-389. London: Academic Press.

Lehninger, A. L. 1975. Biochemistry. 2nd. New York: Worth Publishers.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. 1993. Chapter11. *In* Principle of Biochemistry, 2nd. New York: Worth Publishers.

Leonard, R. H. and Peterson, N. H. 1987. Butanol-Acetone Fermentation of Wood Sugar. Industrial Engineering Chemistry. 39(11):1443-1445.

Lo, Y. M., Yang, S. T. and Min, D. B. 1997. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. Applied microbiology and biotechnology. 47:689-694.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biology Chemistry. 193:265-275.

Manca de Nadra M. C. and Strasser de Saad A. M. 1995. Polysaccharide Production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. International Journal of food Microbiology. 27:101-106.

Manonmani, H. K. and Screekantiah, K. R. 1987. Saccharifiation of sugarcane bagasses from *Aspergillus ustus* and *Tricoderma viride*. Enzyme Microbial Technology. 9:484-488.

Marcura, D. and Townsley, P. M. 1984. Scandinavian ropy milk- identification and characterization of endogeneous ropy *Lactic Streptococcii* and their extracellular excretion. Journal Dairy Science. 67:735-744.

Margaritis, A. and Pace, P. W. 1985. Microbial Polysaccharide. *In* M. Moo Young (ed.), Comprehensive Biotechnology, 1st ed., vol.3. New York: Pergamon Press.

Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. Journal Fermentation Bioengineering. 75(1):18-22.

Mata, J. A., Bejar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C. and Quesada, E. 2006. Exopolysaccharides produced by recently described haolphilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. Research in Microbiology. 157:827-835.

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

Mayer, L. H. 1961. Carbohydrates. Food Chemistry, pp. 73-75. New York : Reinhold Publishing Corporation.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31:426-428.

Moreno, J., Lopez, M. J., Vargas-Garcia, C. and Vazquez, R. 1998. Use of agricultural wastes for xanthan production Xanthomonas campestris. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 21:242-246.

Monica, M. 2003. Microbial polysaccharides. Production, characterization and properties. *In* Food Technology, pp.26-38. Romania: Lucian Blaga University of Sibiu.

Msuoka, S., Tsuchida, T., Matsuchita, K., Adachi, O. and Yoshinaka, F. 1996. A synthesis medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 60(4): 575-579.

Nisizawa, K. 1973. Mode of the action of cellulose. Journal Fermentation Technology. 51:267-304.

Novax, J. S. Tanenbaum, S. W. and Nakas, J. P. 1992. Hetropoysaccharide formation by *Arthrobacter viscosus* grown on xyose and xylose oligosaccharides. Applied and Environmental Microbiology. 58:3501-3507.

Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M. and Tsuchiya, F. 1983. Anti-tumor Polysaccharide from *Lactobacillus* sp. Agricultural Biological Chemistry. 47(7):1623-1625.

Olikawa, T., Ohtori, T. and Ameyana, M. 1995. Production of cellulose from D-arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 59(8):1964-1965.

Olikawa, T., Morino, T. and Ameyana, M. 1995. Production of cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 59(2):331-332.

Pace, G. W. 1981. Microbial polysaccharides. *In* Advances in biotechnology, pp. 433-439. New York: Pergamon Press.

Pace, G. W. and Righelato, R. C. 1991. Production of extracellular microbial polysaccharides. *In* A. Friechter (ed.), Advances in biochemical engineering, Berlin: Springer-Verlag.

Paquat, M., Thonard, P., Foucart, P., Desmonas, P. and Mollet, A. 1984. Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of wastes. London: Elsevier Appied Science Pubblishers.

Parikh, A. and Madamwar, D. 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharide from cyanobacteria. Bioresource Technology. 97:1822-1827.

Parisi, F. 1989. Advance in lignocellulosic hydrolysis and in the utilization of hydrolysates. *In* A. Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, vol.38 . New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

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

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.

Prasertsan, P., Wichienchot, S., Doelle, H. and Kennedy, J. F. 2008. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers. 71: 468-475.

Pual, A. S. 1979. A Survey of Possible New Polysaccharide. *In* J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell. (eds.), Polysaccharide in Food. London: Butterworth.

Rehm, H. J. and Reed, G. 1993. Biotechnology. Weinheim: VCH.

Roberts, C. M., Fett, W. F., Osman, S. F., Wijey, C., Oconnor, J. V. and Hoover, D. G. 1995. Exopolysacharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. Journal Applied bacteriology. 78:463-468.

Roberts, I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 50:285–315.

Roseiro, J. C. 1992. Medium development for xanthan production. Process Biochemistry. 27(3):167–175.

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in b acteria. Journal of Microbiology Reviews. 55(1):35-38.

Ryu, D. D, and Mandel. 1980. Cellulase: biosynthesis and applications. Enzyme Microbial Technology. 2:91-102.

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A. and Victor, Y. 2005. Diute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biochemistry. 40: 3693-3700.

Sanchez-Medina, I., Gerwig, G. J., Urshev, L. Z. and Kamerling, J. P. 2007. Structure of a neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB.B26. Carbohydrate Research. 342:2430–2439.

Santos, M., Teixeira, J. and Rodrigues, A. 2000. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB512 (f). Biochemical Engineering. 4:177-188.

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

Sim, I. M., Thomson, A., Hubl, U., Larasen, N. G. and Furneaux, R. H. 2001. Characterization of polysaccharides synthesized by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943. Carbohydrate Polymers. 45:285-292.

Souw, P. and Demain, A. L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Applied Environmental Microbioogy. 37:1186-1192.

Sternberg, D., Vijaykumar, P. and Reese, E. T. 1977. β-Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Chemistry. 23:139-147.

Stredansky, M. and Conti, E. 1999. Succinoglycan production by solidstate fermentation with *Agrobacterium tumefaciens*. Applied Microbiology and Biotechnology. 52: 332-337.

Stryer, L. 1995. Chapter18. *In* Biochemistry, 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company.

Sun, Y. and Cheng, J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Bioresource Technology. 1599-1606.

Sutherland, I. W. 1977. Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. In Bacterial exopolysaccharides-their nature and production, pp. 27-96. New York: Academic Press.

Sutherland, I. W. 1996. Extracellular polysaccharide. *In* Biotechnology, pp. 615-657. vol6. Weinheim: VCH Stephen.

Tallgren, A. H., Airaksinen, U., Weissenberg, R. V., Ojamo, H., Kuusisto, J. and Leisola, M. 1998. Exopolysaccharide-Producing Bacteria from Sugar Beets. Applied and environmental Microbiology. 65:862–864.

Takeda, M., Ishigami, M., Shimada, A., Matsuoka, H. and Nakamura, I. 1994. Separation and preliminary characterization of acidic polysaccharides produced by *Enterobacter* sp. Journal of fermentation and bioengineering. 78:140-144.

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Tsuchida, T. and Yoshinaga. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing strains suitable for agitated culture. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 59(8):1498-1502.

Tsao, G. T. and Chiang, L. C. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. *In* J. E. Smith, D. R. Berry, B. Kristiansen (eds), The filamentous fungi, pp. 298-326. London: Edward Arnold.

Tsumuraya, Y. and Misaki, A. 1979. Structure of water-insoluble a D-glucan of *Streptococcus salivarius* HHT. Carbohydrate Research. 74:217-225.

Ul-Qader, S. A., Iqbal, L., Aman, A., Shireen, E. and Azhar, A. 2005. Production of dextran from sucrose by a newly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. Turkish Journal Biochemistry. 31(1):21-26.

Vandamme, E. J., De Beats, S. and Steinbuchel, A. 2002. Biopolymers. Polysaccharide I: Polysaccharide from Prokaryotes. Weinheim: Weily-VCH.

Van den Berg, D. J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J. P.,Vliegenthart, J. F. G.,Ledeboer, A. M. and Verrips, C. T. 1995. Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide. Applied Environmental Microbiology. 61:2840-2844.

Vanga, E., Reczwy, K. and Zacchi, G. 2004. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. Humana Press. 114:509-523.

Virkola, N. E. 1975. Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Finland: Aulanko.

Watanabe, K. and Yamanaka, S. 1995. Effect of oxygen in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 59(1):65-68.

Wen, Z., Liao, W. and Chen, S. 2005. Production of cellulase/β-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. Applied Biochemistry and Biotechnology. 121:93-104.

Whiley, R. A. and Beighton, D. 1998. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiology Immunology. 13:195-216.

Whistler, R. L. 1993. Introduction to industrial gums. *In* Industrial gums polysaccharides and their derivatives, pp.1-19. San Diego: Academic Press.

Whistler, R. L. and BeMiller, J. N. 1993. Industrial gums polysaccharides and their derivatives. California: Academic Press.

Woodward, J. 1987. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: problem and potential. *In* Carbon substrate in biotechnology. Oxford: IRL Press.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J. and Saddler, J. N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and β-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. Applied Biochemistry and Biotechnology. 115:1115-1126.

Yalpani, M. and Sanford, P. A. 1987. Commercial polysaccharides: recent trends and developments. *In* Industrial polysaccharides, pp. 311-335. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Yanez, R., Alonso, J. L. and Parajo, J. C. 2004. Production of hemicellulose sugars and glucose from residual corrugated cardboard. Process Biochemistry. 39: 1543-1551.

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

Available from: http://www.biomassmagazine.com [2009, February 27]

Available from: http://www.cargilltexturizing.com. [2009, February 27]

Available from: http:// www.engin.umich.edu. [2009, February 27]

Available from: http://www.greenspirit.org.uk/resources/cellulose.gif. [2009, February 27]

Available from: http://www. learners.in.th. [2009, February 27]

Availabel from: http://www.mtec.or.th. [2009, March 12]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)

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

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998)

ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	1.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ	6.5	

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์และเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

<u>การเตรียมสารเคมี</u>

1) ดีเอนเอส รีเอเจนต์ (DNS reagent)

ชั่งสารไดไนโตรสาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] 5 กรัม ละลายใน 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] 100 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทต [$C_4H_4KNaO_6.4H_2O$] 150 กรัม ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชา อุณหภูมิห้อง

2) 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] 8 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายดีเอนเอส รีเอเจนต์ (DNS reagent) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อดูปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วัดแอกทิวิตีของเซลลูเลส

<u>การเตรียมสารเคมี</u>

1) 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8

ชั่งโซเดียมซิเตรต 14.71 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก 75 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ 4.8 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

2) 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5

ชั่งโซเดียมซิเตรต 7.35 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก 37.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ 4.5 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3) สารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) ความเข้มข้น 2%

ค่อย ๆ เติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 2 กรัม ลงใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4) สารละลายซาลิซิน (D-salicin) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายซาลิซิน 0.4 กรัม ด้วย 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

<u>วิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ด้วยวิธี Carboxymethyl Cellulase Assay</u> (Ghose, 1987)

นำเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

<u>วิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้ากลูโคลซิเดส</u> (Sternberg, 1976)

นำเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายซาลิซินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

คำนวณหา unit of enzyme **ตามวิธีของ** The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ นั้นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 ไมโครโมลของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1นาที

= 0.180 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ค่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคสซิเดส จะได้ว่า

ถ้า 0.180 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 30 นาที มีค่าเท่ากับ 1 /(0.180 x 30)

= 0.185 หน่วย

หากปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 30 นาที มีค่าเท่ากับ ((X) x 0.185) / 0.5 หน่วย

หรืออาจคิดเป็น

แอกทิวิตีเอนไซม์ = (มิลลิกรัมกลูโคส x 0.185) / มิลลิลิตรของเอนไซม์ หน่วย/มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (Leonard, 1987)

1) สารเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

ผสมโพแทสเซียมซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต และซีลีเนียม ในอัตราส่วน 100 : 10 : 1 โดยน้ำหนัก

2) สารละลายกรดบอริกผสมอินดิเคเตอร์

เริ่มต้นจากเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) โดยละลายเมทิลเรด 0.066 กรัม และโบรโมครีซอลกรีน 0.099 กรัม ในเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตรปริมาณ 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ละลายกรดบอริก 40 กรัมในน้ำร้อน ปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร รอให้เย็นแล้วจึงเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสมลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายผสมสีม่วงแดง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นโดยขวดวัดปริมาตรเป็น 2 ลิตร

3) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

<u>การเตรียมสารเคมี</u>

1) สารละลาย Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3,000	มิลลิลิตร

2) สารละลาย Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3) สารละลาย Lowry C

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน

4) สารละลาย Lowry D

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม Lowry C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

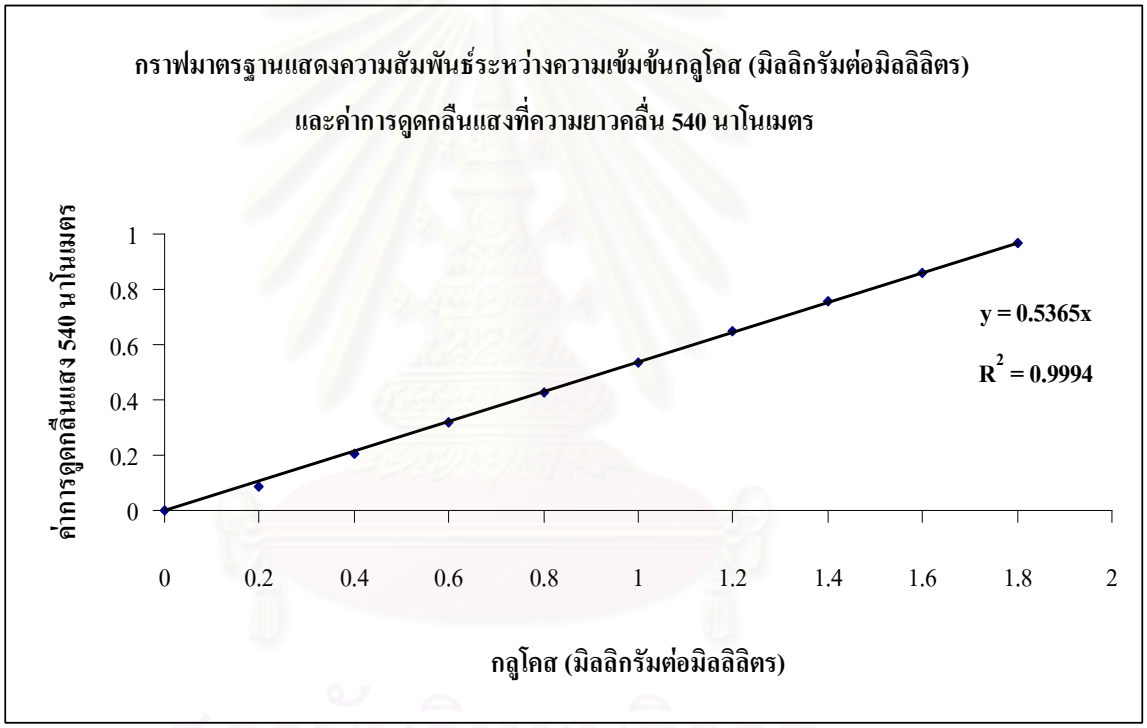
เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนได้จากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

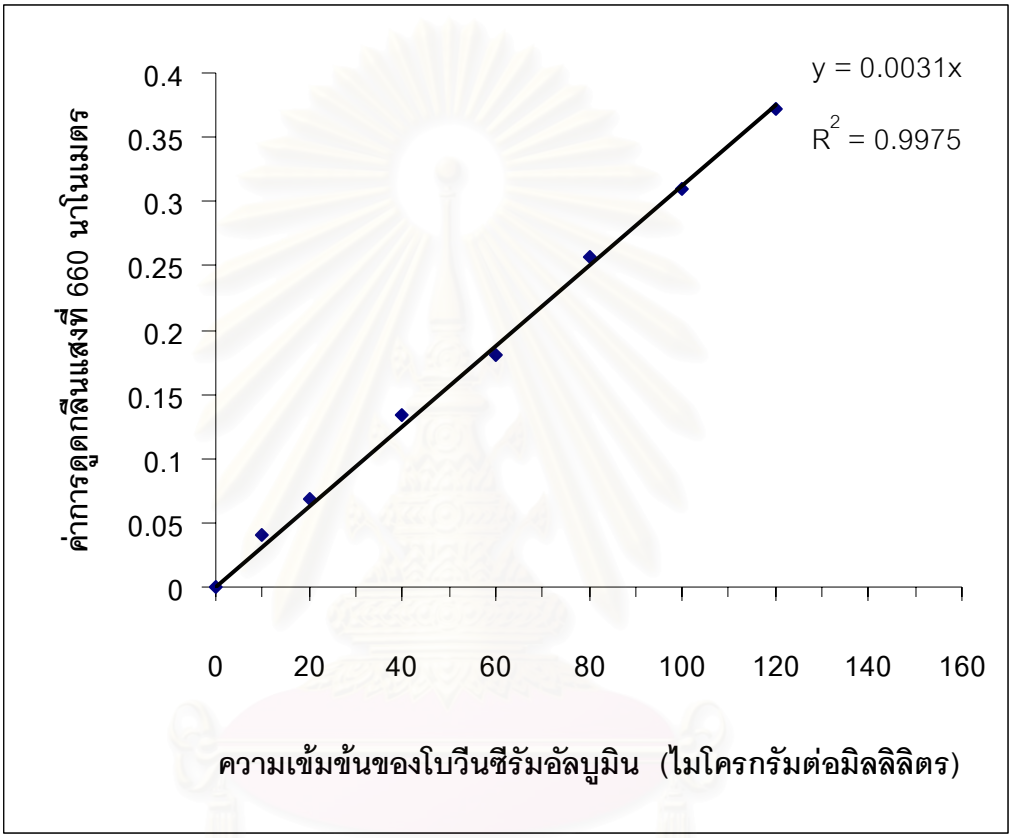
กราฟมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry,1951)

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0 – 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพนิดา เทียมชัยบุตร เกิดวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 ที่อยู่ปัจจุบัน 167/245 ซอยบางแค 10 ถนนสุขาภิบาล 1 แขวงบางแค เขตบางแค กรุงเทพฯ 10160

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย