รายงานการวิจัย

การผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Production of microbial polymer for the application in food industry

นายสุเทพ ธนียวัน และคณะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ **แบบ ต-1ช/ด**

แบบรายงานความก้าวหน้า

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

(ภาษาอังกฤษ) Production of microbial polymer for the application in food industry

ชื่อผู้วิจัย (นาย ~~นาง~~ ~~นางสาว~~ ยศ) รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330

หมายเลขโทรศัพท์ 02-2185070 – 2 โทรสาร 02-2527576 e-mail tsuthep@chula.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2551

งบประมาณที่ได้รับ 580,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 4 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) .....2549..... ถึง (เดือน ปี) .....2553.....

2. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย (โดยสรุป) เพื่อผลิตพอลิเมอร์ที่ปลอดภัย เป็น ที่ต้องการ ในอุตสาหกรรมพวกไอศกรีมและอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการการขึ้นรูปต่างๆ จากจุลินทรีย์ ทำให้สามารถแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่นได้ แม้ว่าสิ่งเหล่านี้มีรายงานการผลิตอยู่แล้วในประเทศอื่นๆ แต่ประเทศไทยมีวัตถุดิบในรูปผลิตผลการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ให้ผลิตสารเหล่านี้ได้ จึงเท่ากับเป็นการดำเนินการชนิดเพิ่มมูลค่าจากสิ่งเหลือใช้มาเปลี่ยนให้เป็นสิ่งที่มีราคาสูงขึ้น และยังอาจได้สารชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์ได้ด้วย ความรู้ที่ได้รับจะทำให้สามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เอง เพื่อใช้อย่างน้อยที่สุดภายในประเทศแทนการนำเข้าในประเทศ อันจะยังผลให้ผลผลิตมีราคาถูกลงสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นได้

2.2 แสดงตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง ในรูปของแผนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ว่ามีกิจกรรม / ขั้นตอนปฏิบัติตามลำดับอย่างไร ตามเอกสารแนบฉบับที่ 1

2.3 แสดงรายละเอียดของผลการดำเนินงาน พร้อมสรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้ดำเนินการไปแล้ว [ทั้งนี้ ให้แนบบทความ ผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ระหว่างที่ทำการวิจัยที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้วหรือบทความที่จะนำไปเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)] ตามรายงานความก้าวหน้าปีที่ 2

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี) ตามเอกสารแนบฉบับที่ 2

2.5 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น 1,236,000 บาท

2.6 งานตามแผนงานวิจัย / โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป ตามเอกสารแนบฉบับที่ 1

2.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหาและหรืออุปสรรค (ถ้ามี) .....-.....

.....

.....

.....

(ลงชื่อ) .....

(.....)

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย / หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ ๒๙ เดือน ม.ค. พ.ศ. ๕๒

ผลการประเมินรายงานความก้าวหน้าของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

สรุปความเห็นของการประเมิน

☐ เห็นควรสนับสนุนให้ดำเนินการต่อไป

☐ ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม .....

.....

.....

.....

(ลายเซ็น)

(.....)

หัวหน้าส่วนราชการ

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

หมายเหตุ : แบบฟอร์มนี้ใช้สำหรับข้อเสนอการวิจัยทั้งแผนงานวิจัยและโครงการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

พอลิเมอร์ เป็นสารที่เกิดจากหน่วยย่อยมาเชื่อมต่อกัน ที่รู้จักกันดีได้แก่ พอลิเพพไทด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน และพอลิแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมต่อกันโดยหน่วยย่อยของมอนอแซ็กคาไรด์ จำนวนย่อย (degree of polymerization) หากมีจำนวนมากจะทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีสมบัติอุ้มน้ำได้ (Morin, 1998) เมื่อละลายน้ำทำให้มีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ ก่อให้เกิดลักษณะข้นหนืดหรือคอลลอยด์ (thickening agent) และเกิดเป็นลักษณะเจล (gelling agent) (Mitchell, 1979) ซึ่งเป็นลักษณะที่พึงประสงค์ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทที่ต้องการความหนืดหรือข้น (Shih และคณะ, 2001; Ashiuchi และคณะ, 2004) พอลิแซ็กคาไรด์มีประโยชน์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร (Margaritis และ Pace, 1985) อุตสาหกรรมการทำความสะอาด การบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมยา และใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร ฯลฯ (Yalpani, 1987) และยังมีคุณสมบัติอื่นๆ อีกขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของพอลิแซ็กคาไรด์นั้นๆ ทำให้สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้เสถียร สารจับเกาะ สารก่อเจล สารทำให้เลือดแข็งตัว สารหล่อลื่น สารขึ้นรูปฟิลม์ สารทำข้น สารที่ให้แขวนลอย (Margaritis และ Pace, 1985) สารช่วยจับตกตะกอน (flocculation) และสารดูดซับ (absorption) (Yalpani, 1987) นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมทางด้านสรีรวิทยาที่หลากหลายในคน เช่น การต่อต้านมะเร็ง (anti-tumor) ไวรัส (anti-viral) และการอักเสบ (anti-inflammatory) และสามารถเป็นตัวกระตุ้นสำหรับ interferon platelet aggregation inhibition และ colony stimulating factor synthesis (Calazans GMT, 1997)

ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสามารถผลิตได้จากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดซึ่งผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยแหล่งใหญ่ๆ ผลิตได้จากพืชและสัตว์ (Whistler และ Miller, 1993) สำหรับจุลินทรีย์นั้นเป็นแหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญเช่นกัน เพราะสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแตกต่างกันกว่า 200 ชนิด ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากพืชมีเพียง 25 ชนิด (Linton และคณะ, 1991) ในปัจจุบันการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์เริ่มมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่ดี เช่น แซนแทนกัมมีคุณสมบัติด้านความหนืด ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูง (thermotolerance) และอีกประการที่สำคัญ คือ ในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้ โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูกาล หรือมลพิษทางทะเล ในขณะที่เราต้องคำนึงถึงปัจจัย

เหล่านี้เมื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย (จันทร์จนา ตันสกุล, 2539) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยควบคุมภาวะที่ใช้ในการหมัก และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็นจำนวนมาก ส่วนการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชยังมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งๆ มักจะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ทำให้ต้องมีขั้นตอนในการแยกพอลิแซ็กคาไรด์ตัวที่ต้องการออกมา ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง (Whistler, 1993)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะให้การสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป (Paul, 1979)ส่วนใหญ่พอลิเมอร์จากแบคทีเรียจะเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อใช้เป็นชั้นแคปซูล (capsule) สำหรับป้องกันเซลล์ และเป็นอาหารสะสมไว้ใช้เมื่อขาดแคลน (Shih และคณะ, 2001; Ashiuchi และคณะ, 2004) หรือบางชนิดที่สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์โดยละลายอยู่ในอาหารเหลวเรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ หรือเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exo-polysaccharide : EPS) จึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพราะง่ายต่อการสกัด และแยกออกจากผนังเซลล์ (Paul, 1979) สารพวกนี้แม้จะมีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และบางกรณีซับซ้อน แต่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ง่ายและรวดเร็วจากวัตถุดิบที่มีราคาถูก จึงมีการใช้สารเหล่านี้ในปริมาณมากแทนสารที่ต้องสังเคราะห์ทางเคมี (Stauffer และ Leeder., 1978)

อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการผลิตสารจำพวกพอลิเมอร์ที่ดำเนินการอยู่นั้นส่วนประกอบจำนวนมากยังต้องพึ่งพาจากต่างประเทศ ทำให้ต้องสูญเสียรายได้จากการนำเข้าสิ่งเหล่านี้ ดังนั้นหากเราสามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เอง ซึ่งทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ผนวกกับการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูง ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดสามารถผลิตสารทางชีวภาพที่มีคุณค่าสูงโดยใช้วัสดุทางการเกษตรได้ ก็จะเป็นการผลิตสารเหล่านี้ได้เองในประเทศทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังมีรายงานว่าสารพวกเดกซ์แทรนโดย Leuconostoc mesenteroides แซนแทนโดย *Xanthomonas campestris* (Stauffer และ Leeder., 1978) เคอร์ดแลนโดย *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (Harada, 1977) สเครอโรกลูแคนโดย *Sclerotium roffsii* ฯลฯ (Harada, 1977; Stauffer และ Leeder., 1978) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดยแบคทีเรียและรา พอลิเมอร์แต่ละชนิดก็มีข้อดีข้อด้อยภายในตัวมันเองตามชนิดการใช้งานที่ต้องการ

จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ที่พึงประสงค์ได้แก่ 1) พอลิเมอร์ที่ผลิตได้ให้ความหนืดสูงที่ความเข้มข้นที่ต่ำ 2) ให้สมบัติทางกายภาพที่ดี 3) สามารถผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และ 4) พอลิเมอร์ถูกปลดปล่อยสู่อาหารเพาะเลี้ยงภายในเวลาอันสั้น (น้อยกว่าหนึ่งอาทิตย์) แต่เชื้อที่แยกจากธรรมชาติอาจให้ผลตรงเพียงบางข้อ จึงจำเป็นต้องมีการหาภาวะที่เหมาะสมเพิ่มด้วย จากข้อมูลนี้จะเห็นได้ว่า มีปัจจัยหลายประการที่สำคัญต่อการคัดเลือกเชื้อและชนิดของพอลิเมอร์ที่ต้องการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรม ทำให้สามารถแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่นได้ ซึ่งแม้ว่าสิ่งเหล่านี้มีรายงานการผลิตอยู่แล้วในประเทศอื่นๆ แต่ประเทศไทยมีวัตถุดิบในรูปผลิตผลการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ให้ผลิตสารเหล่านี้ได้ จึงเท่ากับเป็นการดำเนินการชนิดเพิ่มมูลค่าจากสิ่งเหลือใช้มาเปลี่ยนให้เป็นสิ่งที่มีราคาสูงขึ้น และยังอาจได้สารชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์ได้ด้วย ความรู้ที่ได้รับจะทำให้สามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เอง เพื่อใช้อย่างน้อยที่สุดภายในประเทศแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ อันจะยังผลให้ผลผลิตมีราคาถูกลงสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นได้

การผลิตพอลิเมอร์โดยจุลินทรีย์ในปริมาณมากๆ นั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงความคุ้มทุน อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งสำหรับค่าใช้จ่ายในการผลิต ดังนั้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่ประกอบด้วย Sucrose 4% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% K_2HPO_4 0.9% KH_2PO_4 0.3% Yeast extract 0.2% $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% จึงไม่เหมาะสำหรับการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในขนาดขยายส่วน ทั้งนี้สูตรอาหารระดับนี้หรือที่จะใช้ในอุตสาหกรรมควรมีราคาถูกและให้การเจริญตลอดจนการผลิตสารที่ต้องการได้ดี ปกติแล้วการเข้าสู่สูตรอาหารปัจจัยที่ควรคำนึงถึงอย่างมาก คือ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาจเตรียมได้จากผลิตภัณฑ์เหลือใช้ทางการเกษตร ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนยังอาจเป็นชนิดอินทรีย์ อนินทรีย์ หรือร่วมกัน โดยไนโตรเจนอินทรีย์ก็สามารถเตรียมได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือแหล่งที่มีราคาถูกอื่น ๆ ได้

สืบเนื่องจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม หลังฤดูการเก็บเกี่ยวแต่ละปีจะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ ชานอ้อย กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวันเหลือเป็นจำนวนมากและจากการที่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ (ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ และชานอ้อย) มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เช่น ชานอ้อยมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากถึง 33-41% (Paturua, 1989) ฟางข้าวมี 32.1-36% (Virkola, 1975) เป็นต้น จึงมีการศึกษาเพื่อนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็น

สับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ เช่น แอลกอฮอลล์ กรดอะซีติก และกรดอินทรีย์อื่น ๆ ส่วนกากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวันมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (สุภาพร ชาติวรพงศา, 2536) เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ และชานอ้อย มาย่อย (hydrolyze) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Parisi, 1989) จะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าทำการย่อยเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียว คือ กลูโคส แต่ถ้าการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน

ข้อดีของการใช้เอนไซม์ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ ภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างไม่รุนแรง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกย่อยเปลี่ยนเป็นสาร เช่น เฟอร์ฟูรัล ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนการกัดกร่อนหรือราคาแพง แต่การย่อยด้วยเอนไซม์ต้องมีการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาผ่านการปรับสภาพก่อนเป็นการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยการทำลายโครงสร้างผลึกในเซลลูโลสและสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต กำจัดลิกนิน เพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ง่ายขึ้น และเพิ่มจำนวนพันธะไกลโคซิดิกเพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ง่าย (Dekker และ Wallis, 1983; Parisi, 1989) ทั้งนี้เพื่อให้ได้น้ำตาลใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในปีที่ 2 นี้ จะศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นและหาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ และพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนและสูตรอาหารจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตพอลิเมอร์โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการดำเนินการ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. **การหาภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

1.1 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร

1.2 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

1.3 หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

1.4 วิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

1.5 ศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

1.6 เตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

2. **การพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตพอลิเมอร์จากวัสดุทางการเกษตร**

2.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 (Genecor)

2.2 ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจน

2.3 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตพอลิเมอร์

2.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตพอลิเมอร์ในอาหารสูตรดัดแปลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การหาภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

1.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) โดยแปรแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส (Prasertsan และคณะ, 2008) และแลคโตส (Bajaj และคณะ, 2006) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.1.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 1.1.1 โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนเป็น 0 1 2 3 4 และ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Prasertsan และคณะ, 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่างๆ มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15

นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ และชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.1.3 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 1.1.1 และ 1.1.2 ตามลำดับ ในการทดลองนี้ใช้ $(NH_4)2SO_4$ เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 0 0.057 0.067 0.08 0.1 0.13 และ 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Prasertsan และคณะ, 2008) ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

1.2.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณปริมาณ5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมได้จากข้อ 1.1 โดยปรับอุณหภูมิบ่มเชื้อเป็น 20 25 30 37 40 และ 45 องศาเซลเซียส (Tallon และคณะ, 2003) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) โดยบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.1 แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างเป็น 5.0 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 (Prasertsan และคณะ, 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.2.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) บ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.1 และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเร็วรอบบนเครื่องเขย่าเป็น 0 100 และ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.2.4 การเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงในอาหารปรับปรุงและเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 รวมถึงภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.1 1.2.2 และ 1.2.3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงเริ่มต้นของการเจริญแบบทวีคูณ (early log phase) ช่วงกลางของการเจริญแบบ

ทวีคูณ (mid log phase) และช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเกณฑ์ในการเปลี่ยนจากอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

1.3 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารที่ปรับปรุงสูตร และมีภาวะที่ปรับให้เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามที่ได้ผลในข้อ 1.1 และ 1.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Kumar และคณะ, 2004) จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำส่วนของตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เพื่อช่วยในการละลายและทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ปะปนมากับพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 3 นาที (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545) ตกตะกอนซ้ำด้วยวิธีเดิม และนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้ง และรายงานในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

1.4 การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (ดัดแปลงจากวิธีของ Shih และคณะ, 2001)

นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นปริมาตรเป็น 4 เท่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.5 การศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์(Ueda และคณะ, 1981)

1.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie blue (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

1.5.2 การวิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ที่มีความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) (2 มิลลิกรัม ของพอลิแซ็กคาไรด์ ต่อ 2-3 มิลลิลิตร ของ CPC) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตตะกอนในสารละลาย ถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ จะทำให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง

1.6 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ดัดแปลงจากวิธีของ Leon-Barrios และคณะ (1992)) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 1.4 ปริมาณ 50 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง เลือกใช้คอลัมน์คาร์โบไฮเดรต ชนิด SUGAR SZ5532 ขนาด 6.0x150 มิลลิเมตร ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 60 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์เข้มข้น 80% โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารมาตรฐาน ได้จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

2. การพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตพอลิเมอร์จากวัสดุทางการเกษตร

2.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 (Genecor)

2.1.1 วิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส GC220

วิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสด้วยวิธี Carboxymethyl Cellulase Assay (Ghose, 1987) และวิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์บีต้ากลูโคลซิเดสตามวิธีของ Sternberg (1976)

2.1.2 ปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220

ปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรตามวิธีของ สุภาพร ชาติวรพงศา (2536) โดยนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดที่ผ่านการอบจนแห้งสนิทดีที่ 80 องศาเซลเซียส มาบด ร่อนและคัดขนาด 50 เมช (mesh) และทำการปรับสภาพก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีการดังนี้

- ปรับสภาพฟางข้าวและชานอ้อย ด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1% ร่วมกับการอบไอน้ำ (autoclave ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

- ปรับสภาพแกลบและรำข้าว ด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1% ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาสเซลเซียส) เป็นเวลา 30 และ 10 นาที ตามลำดับ

ล้างวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำที่ผ่านวัสดุออกมามีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.0 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

2.1.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220

หาปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 รวมถึงอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลส GC220

2.1.4 การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบในปริมาณที่เหมาะสม จากข้อ 2.1.3 มาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ตามภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.3 หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)vความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Lyophilizer หรือ Freeze Dryer แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสตด้วยวิธี DNSA เก็บสารละลายน้ำตาลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตพอลิเมอร์

2.2 ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจน

2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสตโดยวิธี Kjeldahl (Leonard, 1987)

ชั่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 1 กรัม ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงาที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากโรงงานน้ำมันพืช (กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวันได้รับมาจากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ส่วนกากงาได้รับมาจากบริษัท ยูเนียนฟูด อินดัสตรี จำกัด) โดยไม่มีการปรับสภาพใดๆ และไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร เติมตัวคะตะไลส์ 7 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรลงไป นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่อง Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% จำนวน 75 มิลลิลิตร นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริกที่ผสมอินดิเคเตอร์ 25 มิลลิลิตร มารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 75-100 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีเขียวใสแล้วจึงนำไปไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

ไทเทรตจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นม่วงแดง คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน จากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\text{ร้อยละไนโตรเจน} = \frac{(A-B)\times C\times 1.4}{V}$$

A คือ ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

C คือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

2.2.2 เตรียมไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (สุภาพร ชาติวรพงศา, 2536)

ชั่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงา 12 กรัมใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปนึ่งอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 40 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้ 10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl และทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer หรือ Freeze Dryer เก็บในตู้เย็น

2.3 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตพอลิเมอร์

2.3.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเริ่มต้นที่แปรผันแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส แป้งมันสำปะหลัง กากน้ำตาล และไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยซานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบด้วยเซลลูเลส GC220 โดยปรับให้มีปริมาณคาร์บอนเท่ากันเพื่อทดแทนซูโครสบริสุทธิ์ 4% ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์การเจริญ

ของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

การสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ โดยการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อใช้ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ตกตะกอนแยกพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้เอทานอล 95% : น้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 2 : 1 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ตะกอนขาวของพอลิแซ็กคาไรด์ ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสใช้ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นนำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาทำให้แห้งในตู้อบแห้งแล้วเก็บตะกอนที่ได้ในเดซิเคเตอร์

2.3.2 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเริ่มต้นที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต และไฮโดรไลเสตของกากถั่วเหลือง กากทานตะวัน และกากงา โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากัน เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสอัตราเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

2.3.3 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้มีปริมาณต่างๆ วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

2.3.4 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.2 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีปริมาณต่างๆ วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

2.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตพอลิเมอร์ในอาหารสูตรดัดแปลง

2.4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิเมอร์โดยใช้คาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารเอียง จากนั้นนำเชื้อถ่ายลงในอาหารสูตรดัดแปลงจากข้อ 2.3 หาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์และติดตามการเจริญโดยการน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป

2.4.2 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์

หาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารสูตรดัดแปลงจากข้อ 2.3 และมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.1 แปรผันอุณหภูมิเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นติดตามประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์และติดตามการเจริญโดยการน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป

จะเห็นว่าผู้วิจัยได้เพิ่มขั้นตอนดำเนินงานวิจัยมากขึ้นจากที่เสนอไว้ในตอนแรก ทั้งนี้เพื่อให้ได้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนและสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิเมอร์โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ที่เหมาะสมที่สุดทั้งในแง่ของการลดต้นทุนการผลิต และประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์ โดยผู้วิจัยได้สนใจนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากงา ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ไม่ได้เสนอไว้ในตอนแรก จึงทำให้ปริมาณไม่ครบตามที่กำหนดไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

1. การหาภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร

จากการศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) จากนั้นติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามวิธีในข้อ 1.3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1.1 สามารถสร้างกราฟรูปแบบการเจริญและการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02

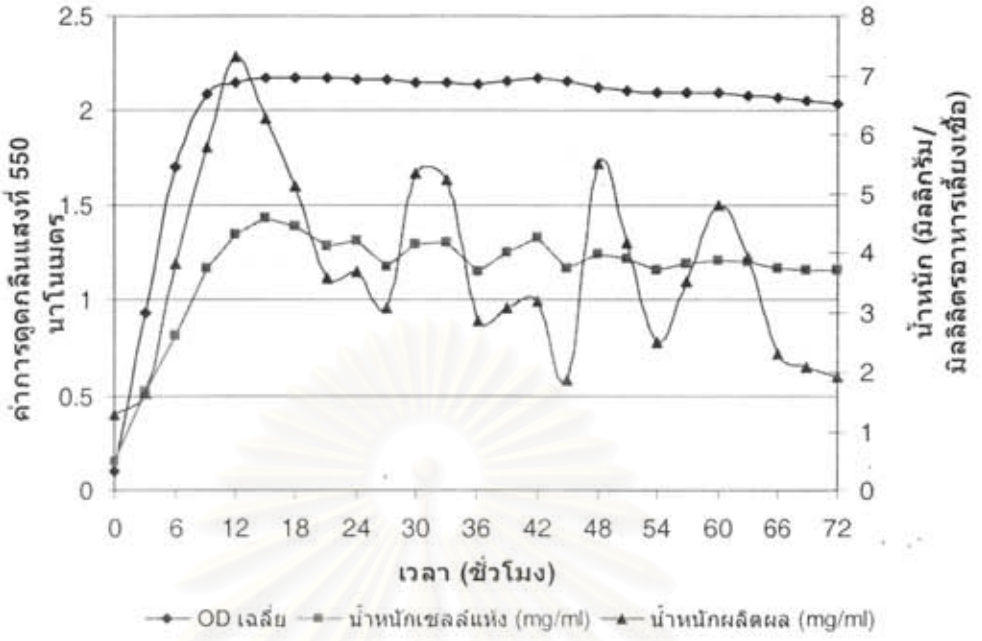
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (mg/ml)
0	0.105	0.488	1.294
3	0.934	1.678	1.648
6	1.702	2.612	3.798
9	2.085	3.720	5.790
12	2.150	4.296	7.322
15	2.171	4.562	6.266
18	2.177	4.430	5.122
21	2.173	4.106	3.572
24	2.164	4.182	3.676
27	2.162	3.744	3.080
30	2.153	4.132	5.334

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.1 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (mg/ml)
33	2.148	4.166	5.240
36	2.143	3.672	2.838
39	2.157	4.011	3.055
42	2.176	4.238	3.186
45	2.154	3.738	1.854
48	2.126	3.966	5.516
51	2.110	3.879	4.159
54	2.099	3.704	2.494
57	2.096	3.817	3.512
60	2.094	3.852	4.806
63	2.082	3.834	3.922
66	2.069	3.718	2.308
69	2.058	3.692	2.075
72	2.037	3.696	1.916

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.1 การเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 จากอาหารที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

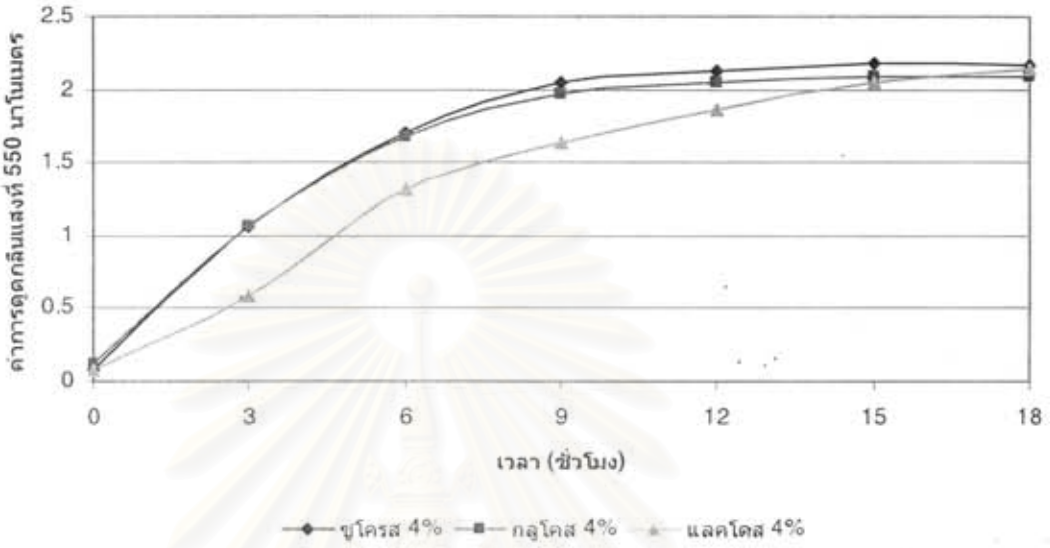
จากกราฟรูปที่ 1.1 พบว่า ปริมาณการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงเรื่อยๆ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เมื่อแบคทีเรียขาดแคลนอาหาร แล้วนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นกลับมาใช้ใหม่ ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไปจึงเก็บตัวอย่างตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญ (primary metabolite)

1.2 ศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

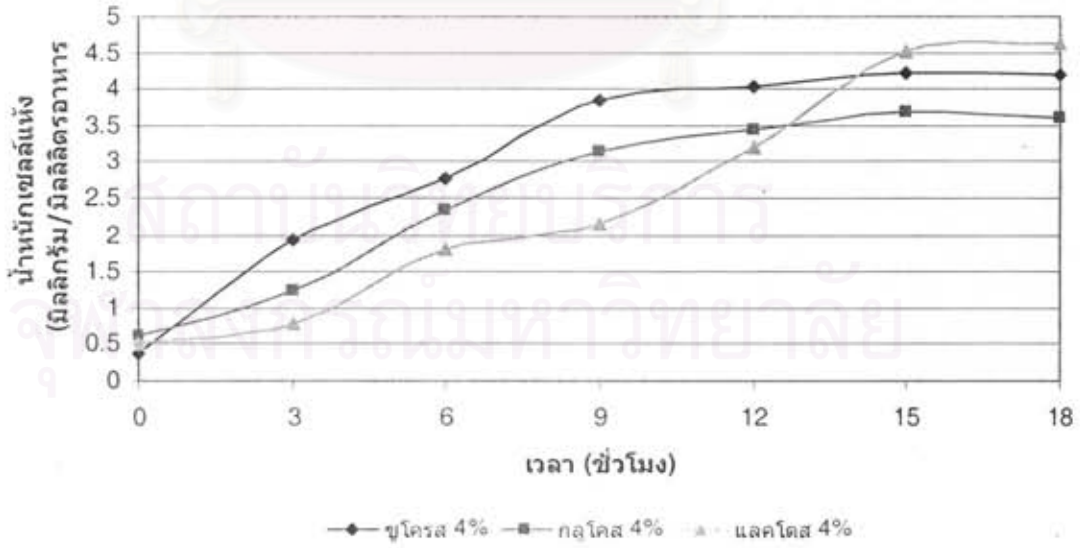
1.2.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และแลคโตส จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดง

ในรูปที่ 1.2 และ 3 พบว่าการใช้ซูโครส และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่าการใช้แลคโตส และจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป

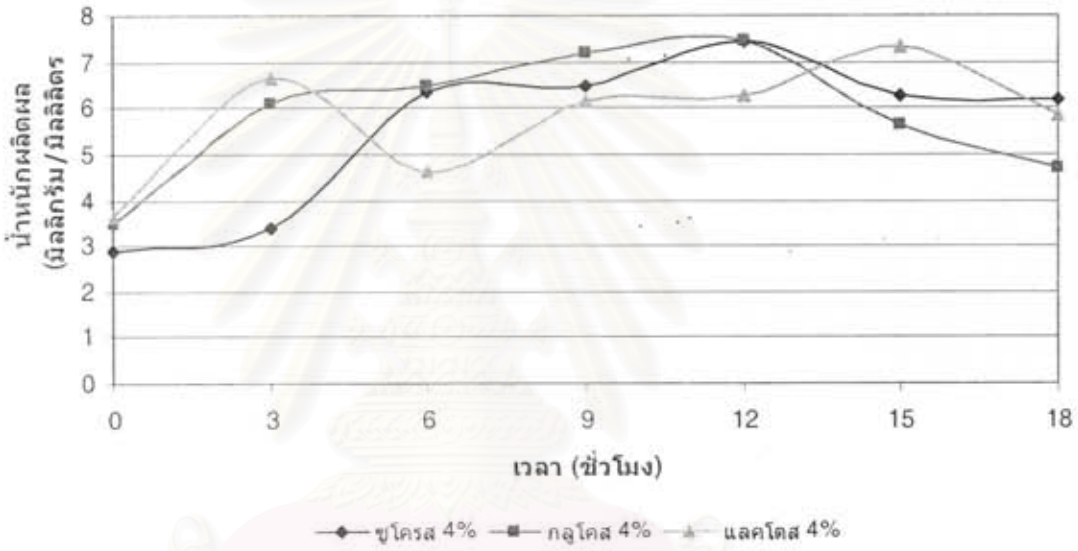


รูปที่ 1.2 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโตส ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 1.3 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโตส ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 1.4 พบว่าการใช้ซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงใกล้เคียงกัน แต่ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่ากลูโคส และลักษณะตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จะมีสีขาวกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอีกทั้งสองชนิดด้วย แสดงในรูปที่ 1.5 ดังนั้นซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด มีน้ำหนักผลิตผลเท่ากับ 7.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงคัดเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



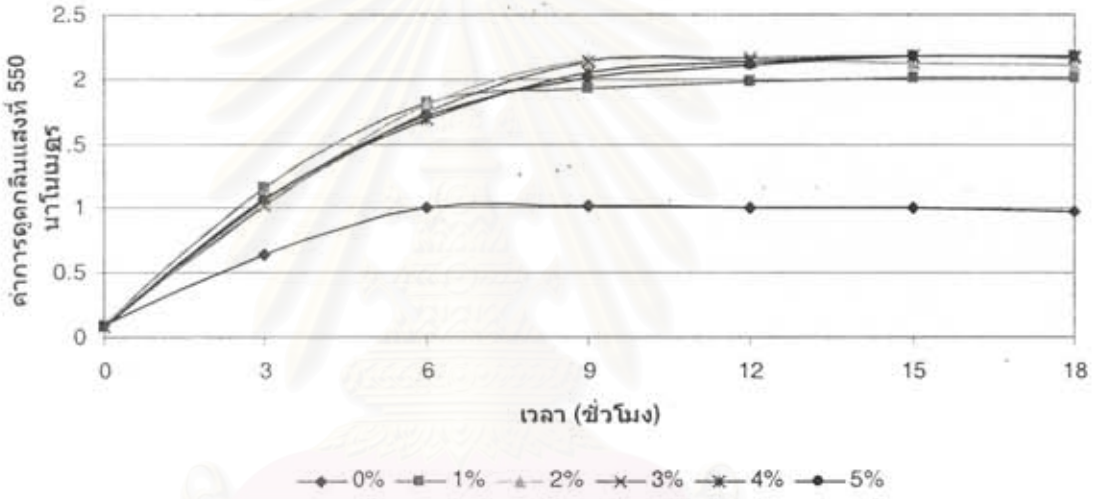
รูปที่ 1.4 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแลคโตส โดยมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากัน ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ก) ข) ค)

รูปที่ 1.5 ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนของ ก) ซูโครส ข) กลูโคส และ ค) แลคโตส

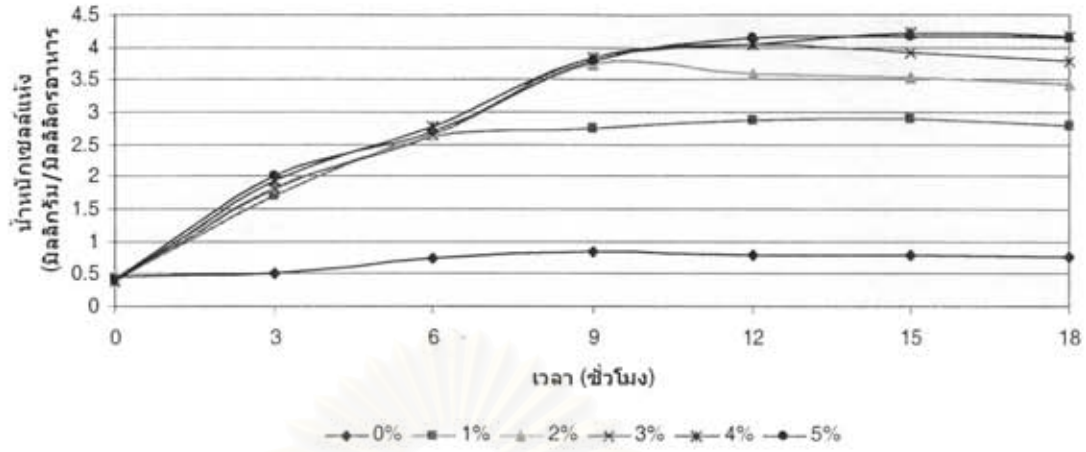
1.2.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 1.1.2 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.6 และ 1.7 พบว่าอัตราการเจริญของการใช้ซูโครสในแต่ละความเข้มข้นมีความสอดคล้องกัน โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสมากขึ้น จะมีการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 1.6 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

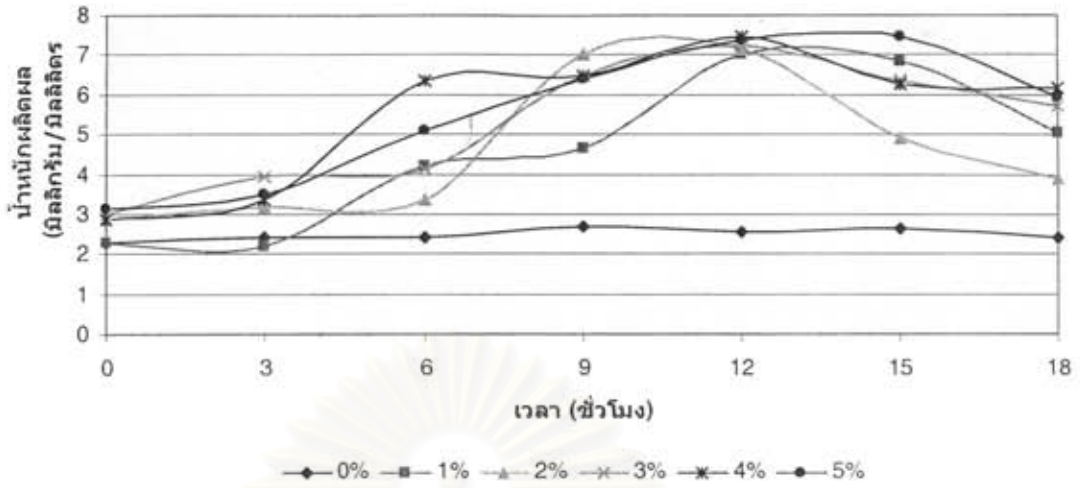
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.8 พบว่าการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 7.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกซูโครสที่ความเข้มข้น 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป

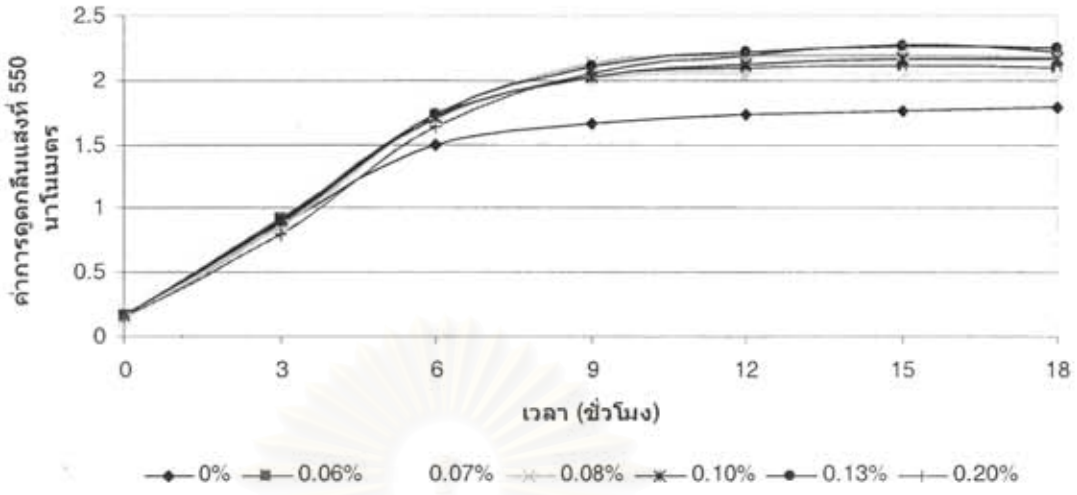
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



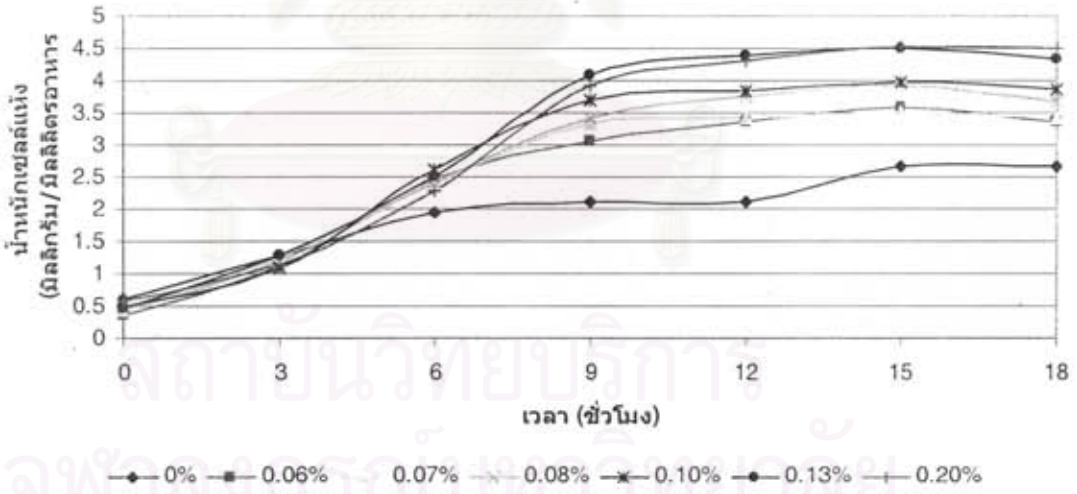
รูปที่ 1.8 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.2.3 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 (คิดเป็น 0.2% 0.13% 0.1% 0.08% 0.067% และ 0.057%) ตามวิธีในข้อ 1.1.3 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.9 และ 1.10 พบว่าการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยอัตราการเจริญของการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ แต่ละความเข้มข้นให้รูปแบบที่ใกล้เคียงกัน และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$

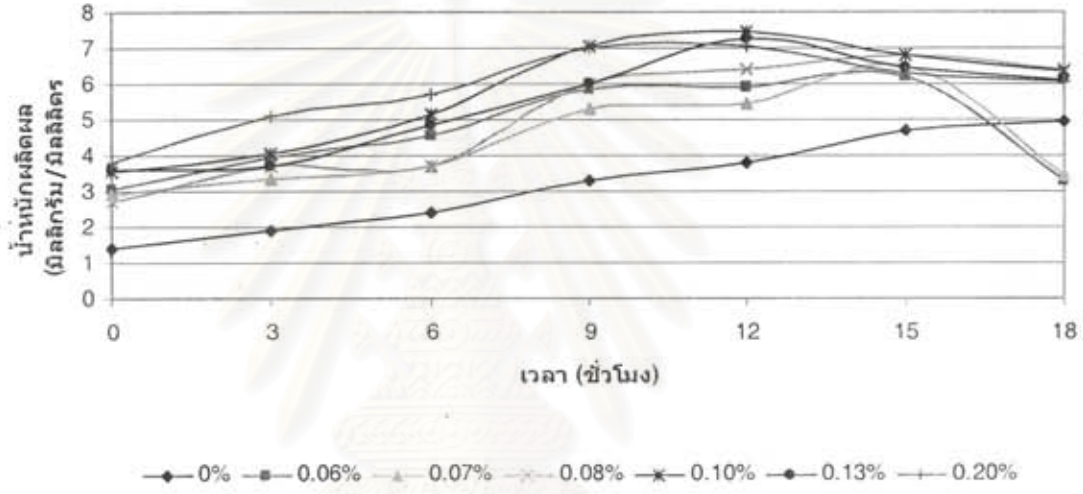


รูปที่ 1.9 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 1.10 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.11 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งการใช้ $(NH_4)_2SO4$ ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 7.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือก $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป



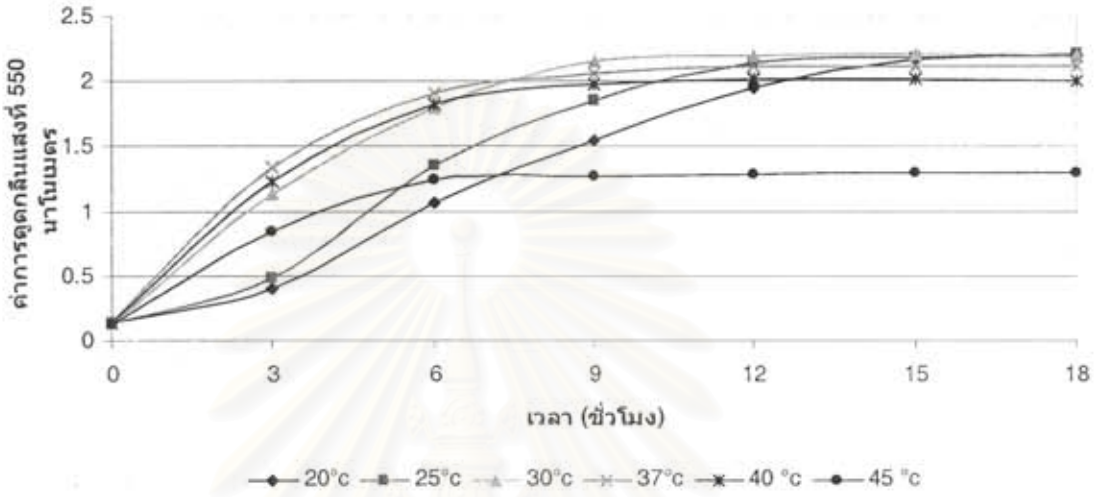
รูปที่ 1.11 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราส่วนซูโครสต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 [ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.0-0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร] ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

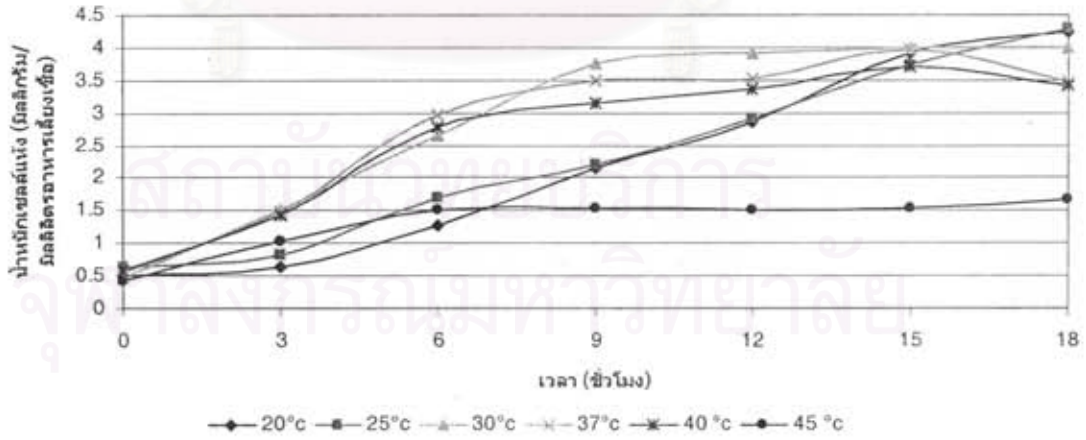
1.3.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส ตามวิธีในข้อ 1.2.1 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.12 และ 1.13 พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญในรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญต่ำสุด

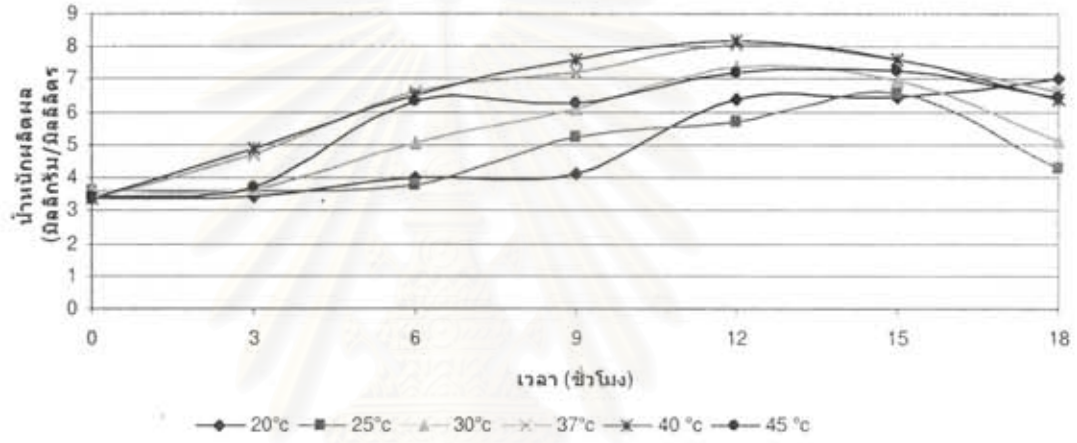


รูปที่ 1.12 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 1.13 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส

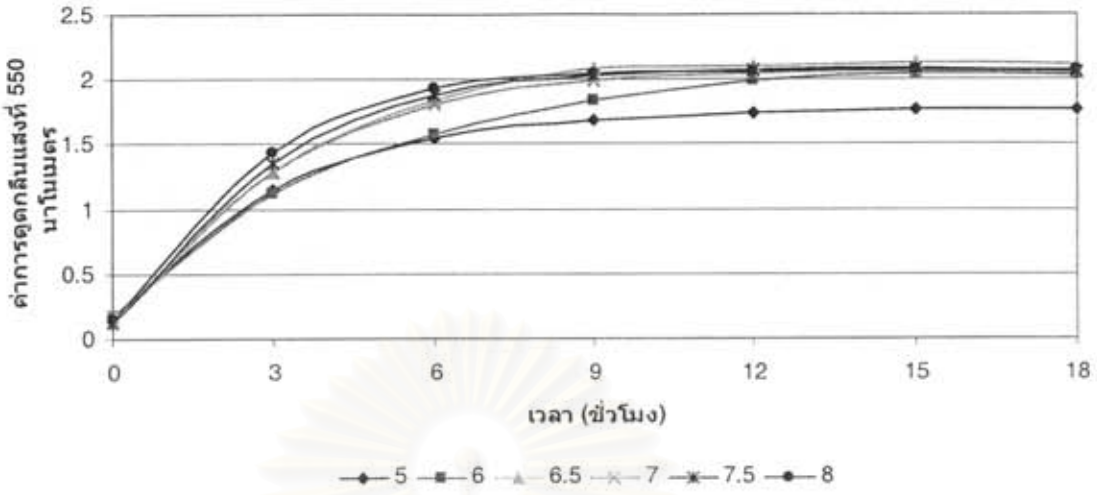
จากการเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.14 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จะมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงเหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากมีน้ำหนักผลิตผลใกล้เคียงกัน (8.06 และ 8.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) แต่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 8.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่ 40 องศาเซลเซียส สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



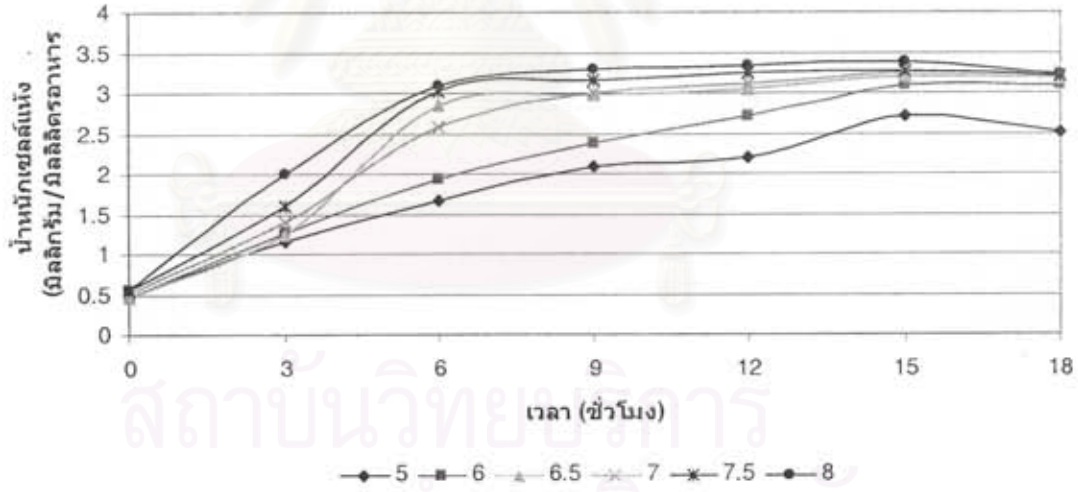
รูปที่ 1.14 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียส

1.3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และปรับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อเป็น 40 องศาเซลเซียส โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 5.0-8.0 ตามวิธีในข้อ 1.2.2 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และชั่งน้ำหนักเซลล์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.15 และ 1.16 พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 6.5-8.0 โดยมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน



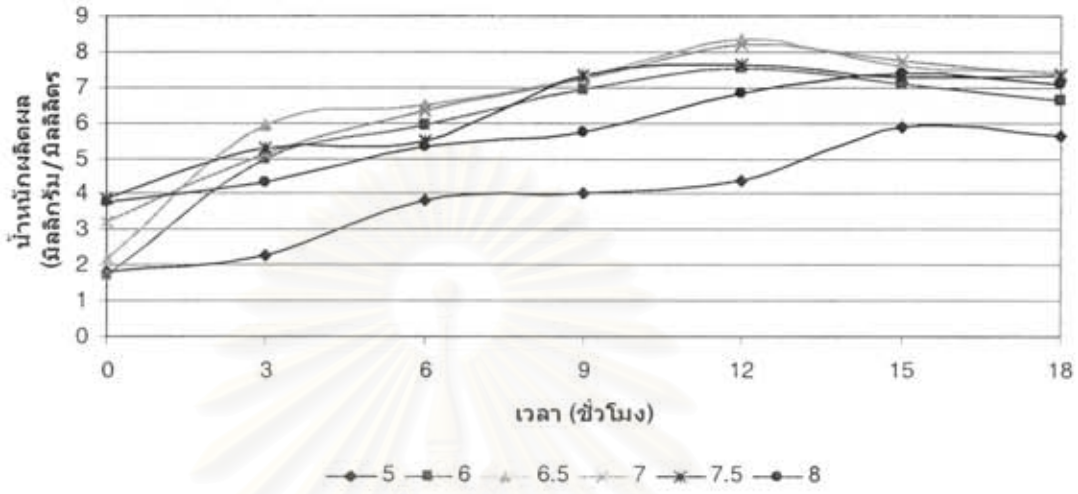
รูปที่ 1.15 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.0-8.0



รูปที่ 1.16 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.0-8.0

จากการเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.17 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และ 7.0 จะมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิต

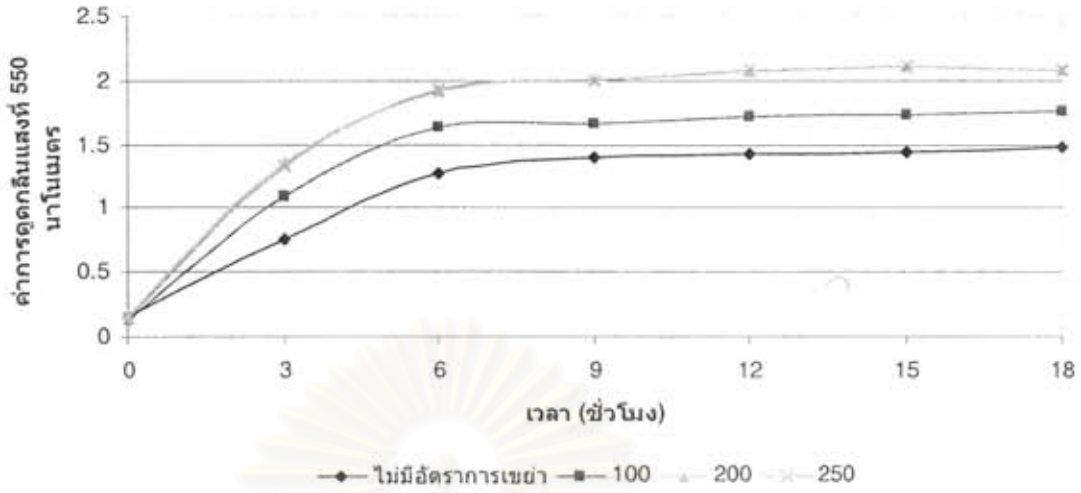
พอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 8.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 สำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



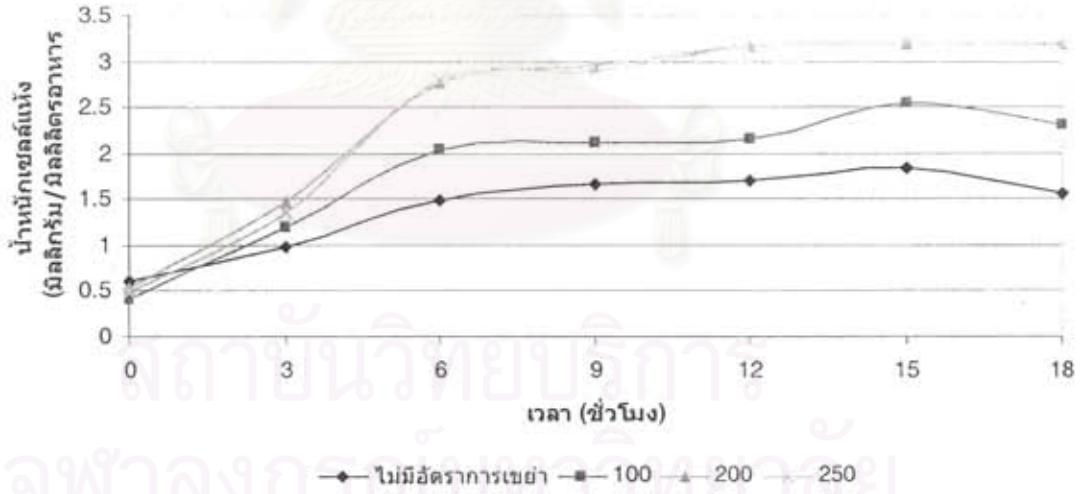
รูปที่ 1.17 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.0-8.0

1.3.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ 5% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที ตามวิธีในข้อ 1.2.3 จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และชั่งน้ำหนักเซลล์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.18 และ 1.19 พบว่าความเร็วรอบที่ 200 และ 250 รอบต่อนาที จะมีอัตราการเจริญที่สูงใกล้เคียงกัน ส่วนที่ไม่ให้อากาศมีอัตราการเจริญต่ำสุด



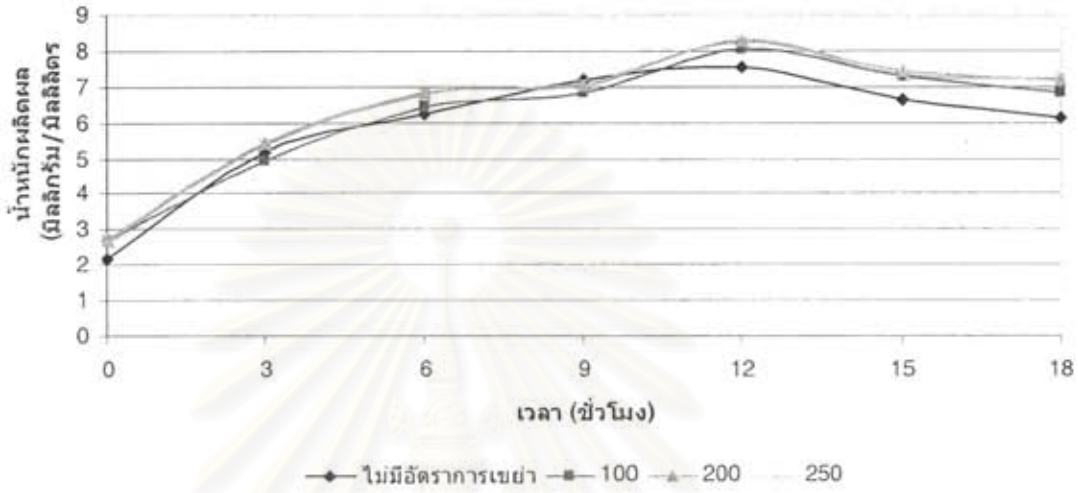
รูปที่ 1.18 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที



รูปที่ 1.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที

จากการเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.20 พบว่าในทุกความเร็วรอบจะมีอัตราการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเร็วรอบที่ 200 รอบ

ต่อนาที จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 8.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกความเร็วรอบในการให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงต่อไป



รูปที่ 1.20 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศระหว่าง 0-250 รอบต่อนาที

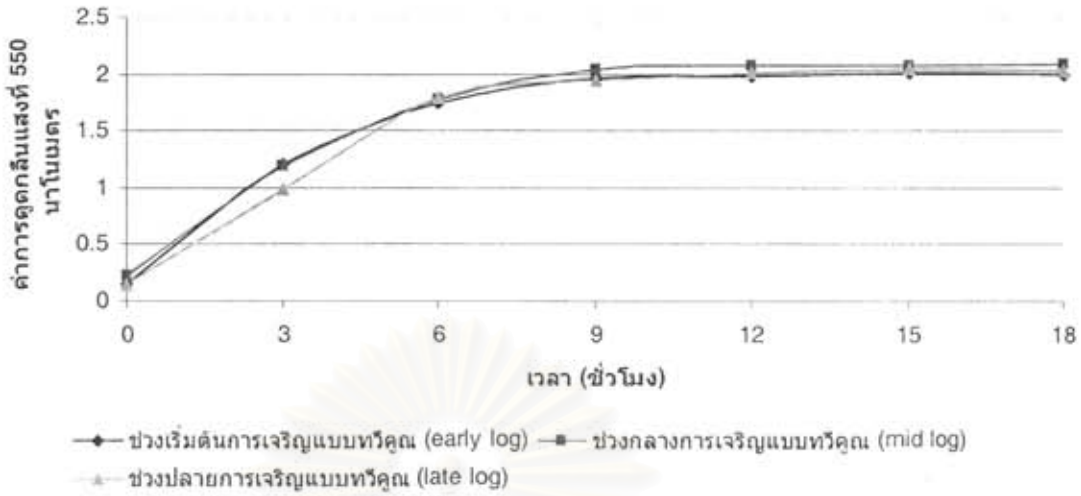
จากการคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1.2 จะเห็นได้ว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวที่ใช้ซูโครส 4.0% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงเท่ากับ 8.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1.2 ซึ่งการทดลองต่อไปจะนำพอลิแซ็กคาไรด์จากการปรับปรุงมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% โดยปริมาตร

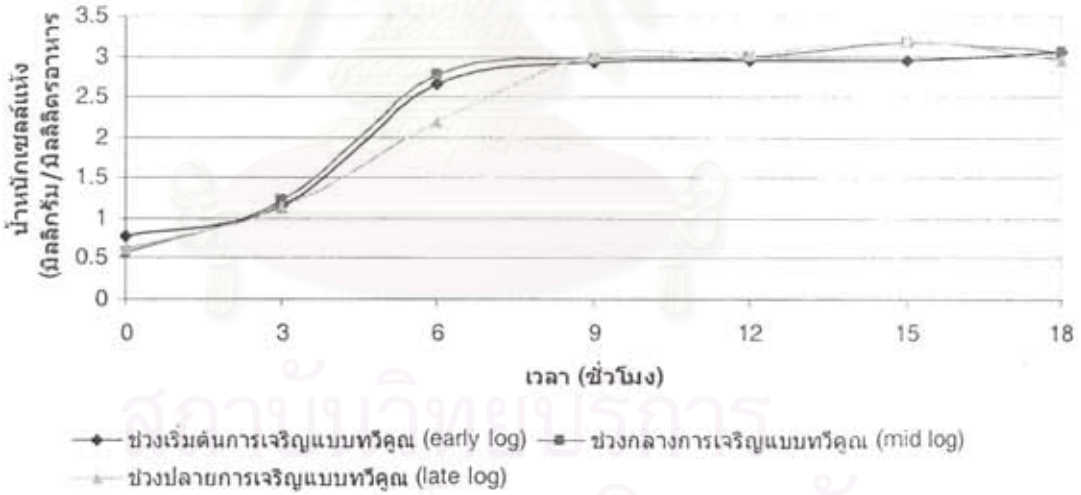
ชนิดและปริมาณของสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์					ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ	pH	การให้อากาศ (รอบ/นาที)	
ซูโครส 4.0% โดยน้ำหนัก	$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% โดยน้ำหนัก	40 องศาเซลเซียส	6.5	200	8.32

1.3.4 การเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ

จากการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 มีค่าการดูดกลืนแสงมากสุดที่ประมาณ 2.0 แต่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงทำการเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงเริ่มต้นของการเจริญแบบทวีคูณ (early log phase) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.559 ช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.974 และช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 1.448 จากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในแต่ละช่วงของการเจริญแบบทวีคูณ จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และชั่งน้ำหนักเซลล์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.21 และ 1.22 พบว่า ในทุกช่วงของการเจริญแบบทวีคูณมีอัตราการเจริญสูงใกล้เคียงกัน โดยช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) มีอัตราการเจริญที่เร็ว และสูงกว่าช่วงเริ่มต้น (early log phase) และช่วงปลาย (late log phase) ของการเจริญแบบทวีคูณเล็กน้อย



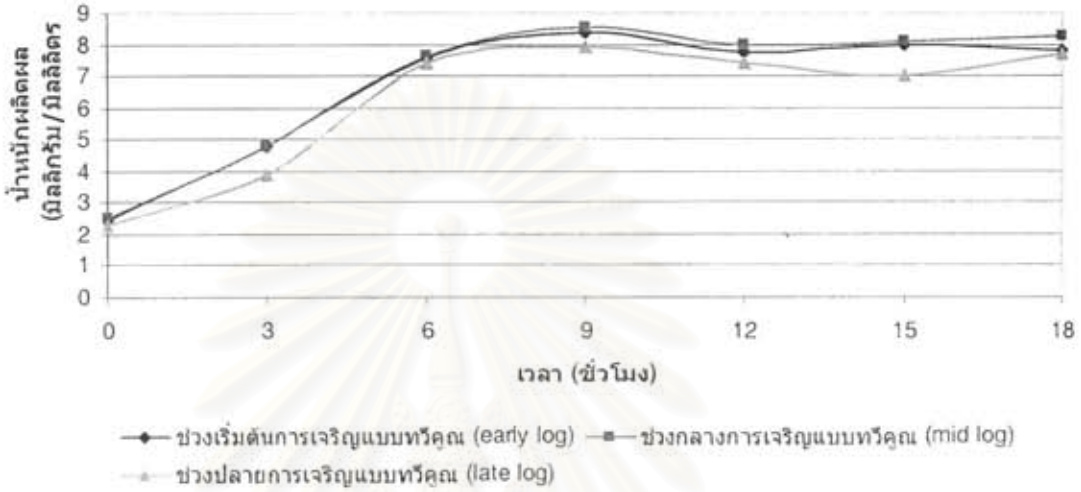
รูปที่ 1.21 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย



รูปที่ 1.22 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย

จากการเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.23 และตารางที่ 1.3 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เร็วขึ้นจากชั่วโมงที่ 12 เป็นชั่วโมงที่ 9 และช่วงกลางการเจริญแบบ

ทวีคูณ (mid log phase) มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงกว่าเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากการปรับปรุงภาวะที่เหมาะสมของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 1.4



รูปที่ 1.23 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 เมื่อเลี้ยงในอาหารและภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วเปลี่ยนไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามช่วงการเจริญของแบคทีเรีย

ตารางที่ 1.3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณโดยเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ไปที่ 40 องศาเซลเซียส

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

ตารางที่ 1.4 เปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และเวลาในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

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

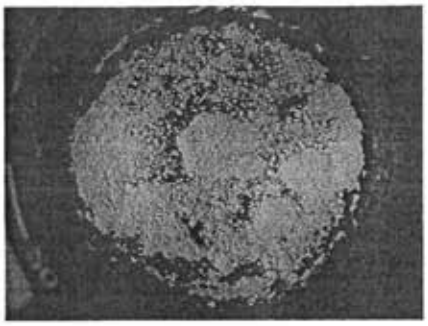
1.4 ศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

1.4.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)

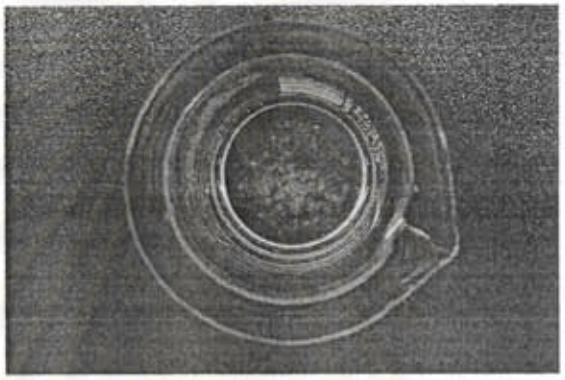
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากการปรับปรุงสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสม มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีของ Bradford (1976) ตามวิธีในข้อ 1.5.1 พบว่าปริมาณโปรตีนในตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ในชั่วโมงที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์สูง มีค่าเท่ากับ 0.29 เปอร์เซนต์

1.4.2 วิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากการปรับปรุง และผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ดังรูปที่ 1.24 มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล และเติมสารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ที่มีความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 1.5.2 พบว่ามีตะกอน แสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ดังแสดงในรูปที่ 1.25



รูปที่ 1.24 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02



รูปที่ 1.25 ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่เกิดขึ้นจากการหาซนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

2. การพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตพอลิมอร์จากวัสดุทางการเกษตร

2.1 วิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส GC220 (Genecor)

ตารางที่ 2.1 ผลการวิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส GC220 (Genecor)

เอนไซม์	แอคทิวิตีของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	เอนโดกลูคาเนส	บีต้ากลูโคซิเดส
GC220	86.66	131.39

2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220 (Genecor)

2.2.1 ผลของปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220

นำรำข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มาแปรผันปริมาณตั้งแต่ 1-10% มวลต่อปริมาตร ย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 2.1

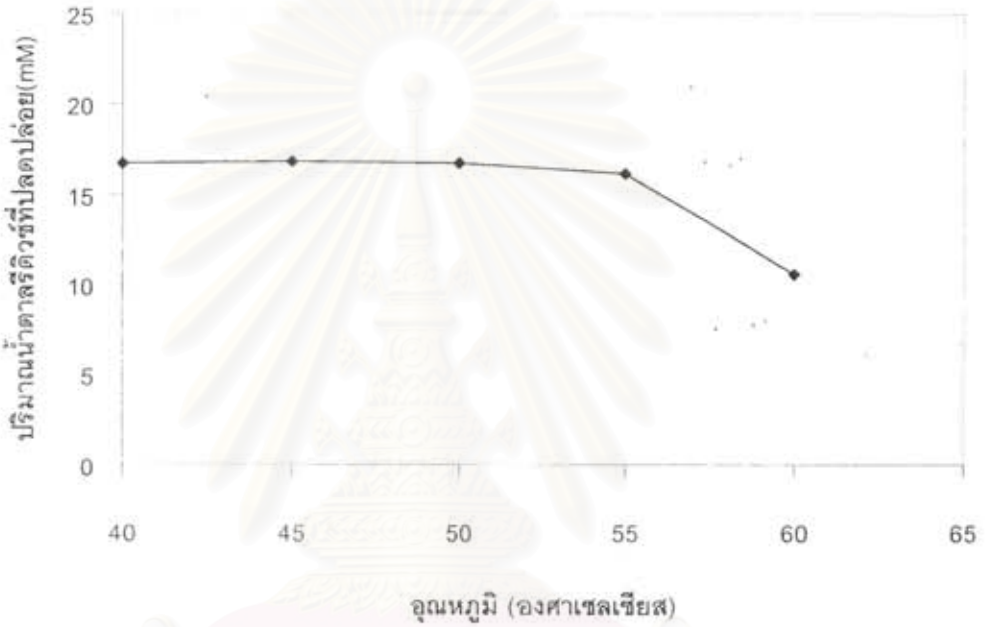
รูปที่ 2.1 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยรำข้าวปริมาณต่างๆ ด้วยเซลลูเลส GC220 ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ผลการแปรผันปริมาณรำข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ตั้งแต่ 10-100 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรำข้าวเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.1 แต่เพื่อให้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ดีจึงลดปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรลงเป็น 50 กรัมต่อลิตร

สำหรับในงานวิจัยเรื่องผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลส GC220 ได้เลือกศึกษาการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส GC220 เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในโรงงานน้ำตาลจึงเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ โดยนำชาน

อ้อย 5% มวลต่อปริมาตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มาแปรผันอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการย่อยวัตถุดิบด้วยเซลลูเลส GC220 หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที กรองแยกตะกอน วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยวิธี DNSA

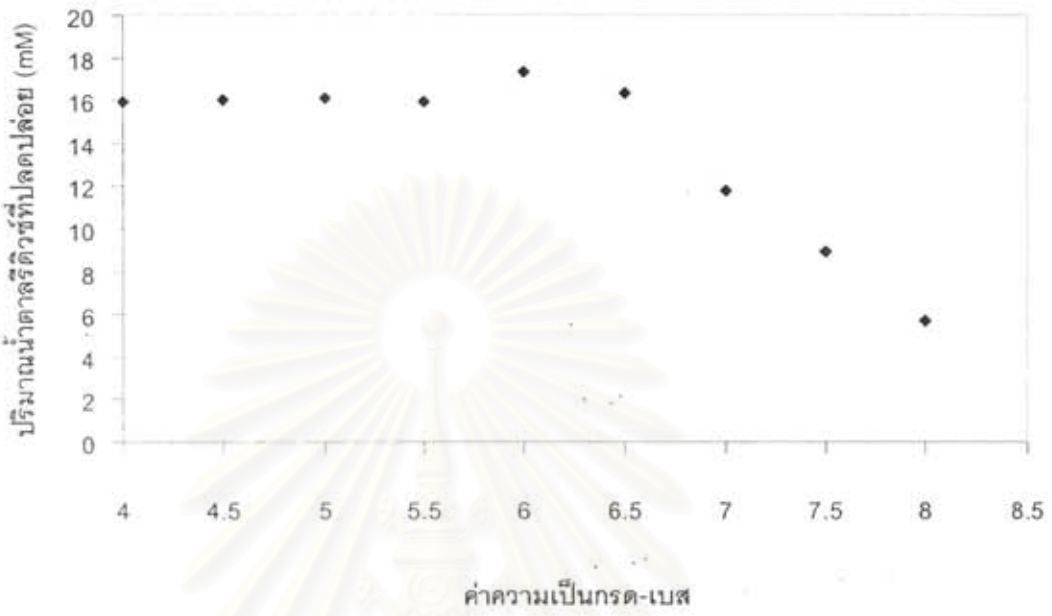
2.2.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลส GC220



รูปที่ 2.2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ด้วยเซลลูเลส GC220

จากรูปที่ 2.2 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส GC220 อยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส โดยในการดำเนินงานวิจัยขั้นต่อไปได้เลือกใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2.2.3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการย่อยซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลสGC220

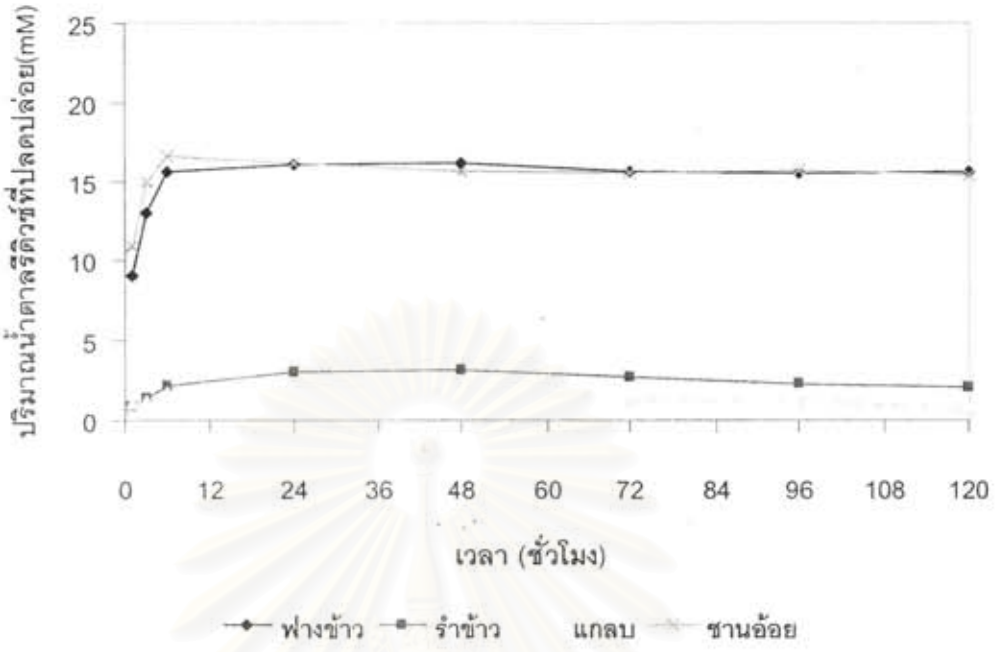


รูปที่ 2.3 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยซานอ้อยที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ ด้วยเซลลูเลส GC220

จากรูปที่ 2.3 จะเห็นว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยซานอ้อยด้วยเซลลูเลส GC220 คือ 6.0

2.2.4 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลส GC220

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ซานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว 50 กรัมต่อลิตร มาแปรผันเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 6.0 อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เวลา 1 3 6 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยเซลลูเลส GC220

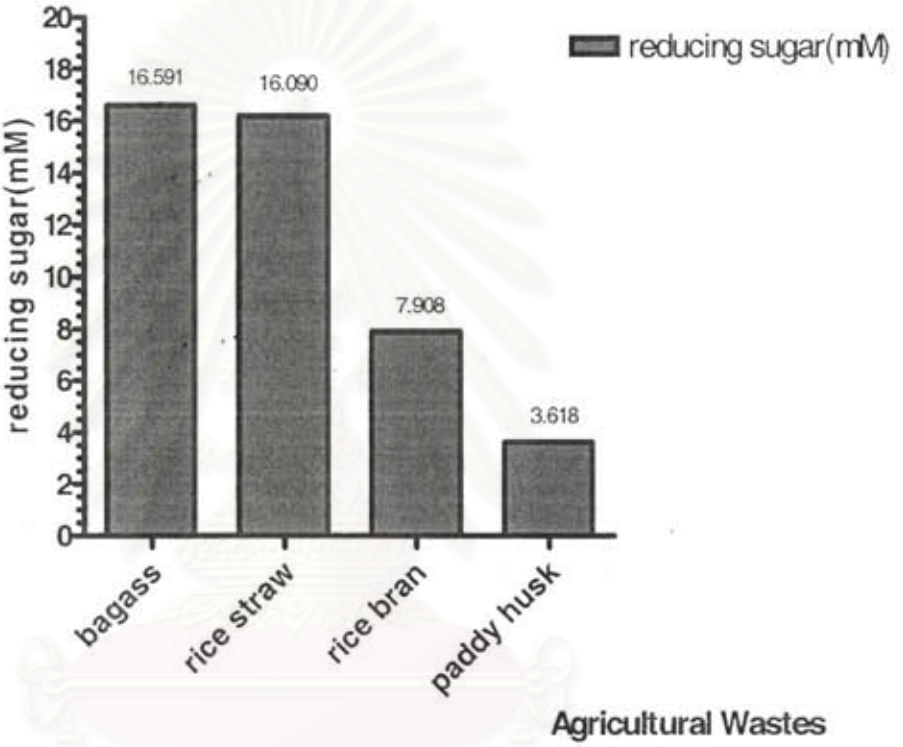
ตารางที่ 2.2 สรุปภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220

ภาวะที่ใช้	ชานอ้อย	ฟางข้าว	รำข้าว	แกลบ
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	45	45	45	45
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	6.0	6.0	6.0	6.0
เวลา (ชั่วโมง)	6	48	48	24

ค่าอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยฟางข้าว รำข้าว และแกลบด้วยเซลลูเลส GC220 ได้ใช้ค่าของภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยชานอ้อย เนื่องจากเป็นเอนไซม์จากแหล่งเดียวกัน อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ควรเป็นค่าเดียวกัน ส่วนเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเอนไซม์ได้แปรผันตามชนิดของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

2.2.5 ผลการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส GC220

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ 5% มวลต่อปริมาตร ที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลาที่เหมาะสมตามตารางที่ 2.2 ได้ผลดังรูปที่ 2.5



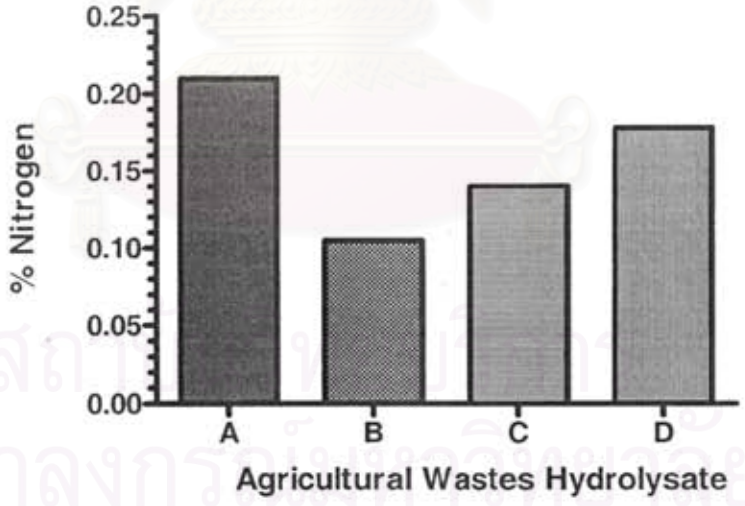
รูปที่ 2.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดจากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ จากการย่อยด้วยเซลลูเลส GC220 ตามภาวะที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 2.3 ปริมาณไนโตรเจนของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสต

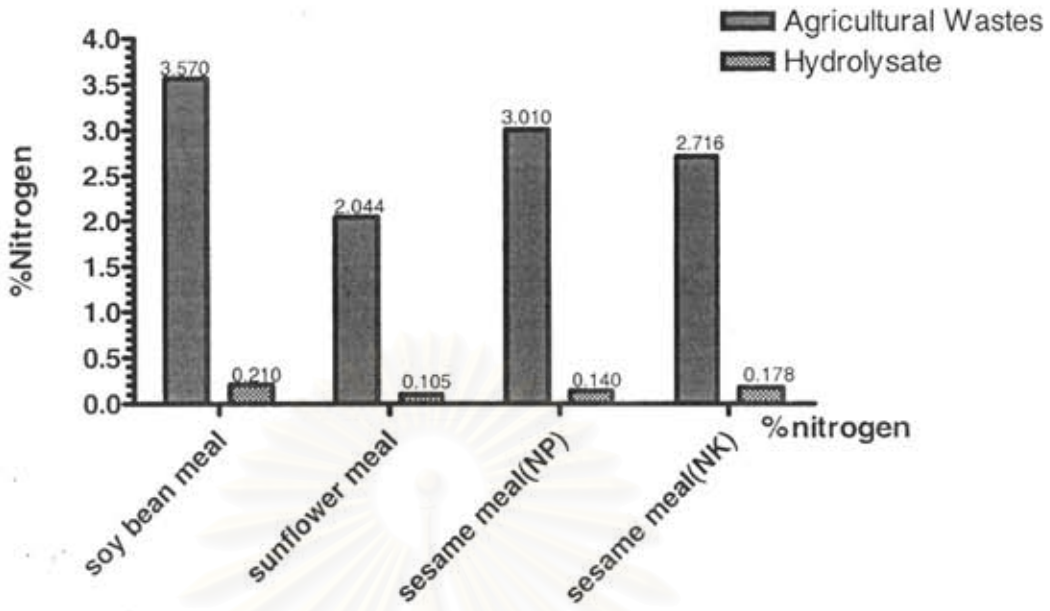
ตัวอย่าง	ร้อยละไนโตรเจน		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
กากถั่วเหลือง	3.416	3.724	3.570
กากเมล็ดทานตะวัน	2.044	2.044	2.044
กากงา (นครปฐม)	2.940	3.080	3.010
กากงา (หนองแขม)	2.744	2.688	2.716
ไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลือง	0.196	0.224	0.210
ไฮโดรไลเสตจากกากเมล็ดทานตะวัน	0.112	0.098	0.105
ไฮโดรไลเสตจากกากงา (นครปฐม)	0.140	0.140	0.140
ไฮโดรไลเสตจากกากงา (หนองแขม)	0.161	0.196	0.178



รูปที่ 2.6 ปริมาณไนโตรเจนจากไฮโดรไลเสตของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ

A = ไฮโดรไลเสตของกากถั่วเหลือง B = ไฮโดรไลเสตของกากเมล็ดทานตะวัน

C = ไฮโดรไลเสตของกากงา(นครปฐม) D = ไฮโดรไลเสตของกากงา(หนองแขม)



รูปที่ 2.7 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนระหว่างเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและไฮโดรไลเสตจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด (NP : นครปฐม, NK : หนองแขม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

จันทร์จนา ตันสกุล. 2539. การคัดเลือกเชื้อและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ. 2545. การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Streptococcus sobrinus* 6715 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

Ashiuchi, M., Shimanouchi, K., Nakamura, H., Kamei, T., Soda, K., Park, C., Sung, M. H. and Misono, H. (2004). Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly gamma-glutamate and regulation of its stereochemistry. Appl Environ Microbiol 70(7): 4249-55.

Bajaj, I. B., Saudagar, P. S., Singhal, R. S. and Pandey, A. (2006). Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. J Biosci Bioeng 102(3): 150-6.

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

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

Calazans GMT, L. C., Lima RMOC, de Franc FP. 1997. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnol Lett 19: 19-21.

Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. 1986. Carbohydrate analysis : a practical approach. Washington,D.C., IRL Press.

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

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric

method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

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

Harada, T. 1977. Production, properties, and application of curdlan. Washington.

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

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

Leonard, R. H. and Peterson, N. H. 1987. Butanol-Acetone Fermentation of Wood Sugar. Ind. Eng. Chem. 39(11):1443-1445.

Leon-Barrios, M., Gutierrez-Navarro, A. M., Perez-Galdona, Diaz-siverio, J., Trujillo, J. and Corzo, J. 1992. Acidic polysaccharide from *Bradyrhizobium* (*Chamecytisus proliferus*). Journal of applied bacteriology 72: 91-96.

Linton, J. D., Ash, S. G. and Huybrechts 1991. Microbial polysaccharides. New York.

MacFaddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore, USA, Williams & Wilkins.

Margaritis, A. and Pace, P. W. 1985. Microbial polysaccharide. In Moo Young, M. (ed.), Comprehensive Biotechnology. vol. 3.

Mitchell, J. R. 1979. Rheology of polysaccharide solution and gel. London.

Morin, A. 1998. Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production, and recovery of microbial polysaccharides. In Polysaccharides: 275-296

Parisi, F. 1989. Advance in Lignocellulosic Hydrolysis and in the Utilization of Hydrolysates. In Fiechter A. (ed.), Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, vol.38, Springer-Verlag Berlin Heidelberg : New York.

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

Paul, A. S. 1979. A survey of possible new polysaccharides. London.

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

71: 468-475.

Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G. and Chang, Y. N. 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. Bioresour Technol 78(3): 267-72.

Stauffer, K. R. and Leeder., J. G. 1978. Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey. Journal Food Science 43: 756-758.

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

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.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by Lactobacillus plantarum EP56. Res Microbiol 154(10): 705-12.

Ueda, S., Fumiko, M., Osajima, K. and Ito, K. 1981. Extracellular polysaccharide produced by strain No.626 of Aeromonas hydrophila. Agricultural Biological Chemistry 45: 1977-1981.

Virkola, N. E. 1975. Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, p.23. In Bailey, M. Enari, T. M. and Linko, M., eds., SITRA, Aulanko, Finland.

Whistler, R. L. 1993. Introduction to industrial gums. Industrial gums polysaccharides and their derivatives. R. L. Whistler and J. N. B. Miller. San Diego, Academi Press, Inc.: 1-19.

Whistler, R. L. and Miller, J. N. B. 1993. Introduction to polysaccharides. Industrial gums polysaccharides and their derivatives. California, Academic Press.

Yalpani, M. 1987. Industrial polysaccharides : genetic engineering, structure/property relations and applications. Amsterdam, Elsevier Science.

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยโดยละเอียด

ขั้นตอน	กิจกรรม	ปีที่ 1				ปีที่ 2				ปีที่ 3				ปีที่ 4			
		1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12
1.	เก็บตัวอย่างและแยกจุลินรีย์จากแหล่งต่างๆ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์และจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์	——— ·····	——— ·····	——— ·····	——— ·····												
2.	ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้					———	——— ·····	·····									
3.	ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์โดย จุลินทรีย์ที่แยกได้							——— ·····	——— ·····								
4.	ปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น และศึกษาคุณสมบัติของสาร									——— ·····	——— ·····	——— ·····	——— ·····				

5.	ผลิตพอลิเมอร์และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี									——— ·····	——— ·····						
6.	วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์และวิเคราะห์หามวลโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี											———	———	———	———		
7.	การผลิตพอลิเมอร์ในระดับถังหมัก												———	———	———	———	
8.	การศึกษาสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์													———	———	———	———
9.	รวบรวมและสรุปผลการทดลอง															———	———

หมายเหตุ ——— แผนการดำเนินงานที่วางไว้

····· แผนการดำเนินงานที่ทำการวิจัยแล้ว

รายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน

ข้อ 1

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ชนิดใหม่ๆ ดังนั้นจึงไม่ได้จำเพาะเจาะจงว่าจะต้องเป็นพอลิแซคคาไรด์ชนิดใด ทั้งนี้พอลิเมอร์ชนิดใหม่ ๆ จะตีพิมพ์ได้ง่ายกว่าที่พบมาก่อนหน้า

ข้อ 2

จะนำข้อเสนอแนะนี้ไปปรับใช้ในการศึกษาต่อไป

ข้อ 3

ผู้วิจัยตระหนักถึงปัญหานี้จึงได้ทำทั้งการวัด optical density ควบคู่กับ dry weight ของเซลล์ในการติดตามการเจริญของแบคทีเรียเป็นการเปรียบเทียบ

ข้อ 4

การกลายพันธุ์เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปเพื่อให้ได้ผลผลิตหรือลักษณะที่เป็นที่ต้องการให้ดีกว่าเดิม ข้อมูลเบื้องต้นที่ทำปรากฏว่าได้ผลผลิตเพิ่มจาก wild type 2-3 เท่าซึ่งจะรายงานในการรายงานความก้าวหน้าฉบับต่อไป

ข้อ 5

ในแต่ละการทดลองผู้วิจัยได้ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำทุกการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย