



การผลิตและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนึ่งปาล์มและ  
เชื้อรา *Cordyceps* sp. ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปาล์ม

**Production and Properties of Biopolymers from Sterilizer Condensate of  
Palm Oil Mill and Fungus *Cordyceps* sp. Cultivated in Sterilizer  
Condensate of Palm Oil Mill**

จิตตพัฒน์ เพ็ญสวัสดิ์

**Jittapat Pensawat**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Biotechnology  
Prince of Songkla University**

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      การผลิตและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งป่าล้มและเชื้อรา  
   *Cordyceps* sp. ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าล้ม

ผู้เขียน                      นางสาวจิตตพัฒน์ เพ็ญสวัสดิ์

สาขาวิชา                    เทคโนโลยีชีวภาพ

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ)

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลาปี มณีรัตน์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ)

.....กรรมการ  
(ดร.ภาวดี เมฆะกานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนึ่งปลาล์มและเชื้อรา <i>Cordyceps</i> sp. ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปลาล์ม
ผู้เขียน	นางสาวจิตตพัฒน์ เพ็ญสวัสดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2552

### บทคัดย่อ

น้ำนึ่งปลาล์มเป็นหนึ่งในสามแหล่งน้ำทิ้งที่สำคัญของโรงงานสกัดน้ำมันปลาล์ม เมื่อวิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้ง พบว่ามีค่าต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ มีพีเอช 5.05 ค่าซีไอดีทั้งหมด 120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งทั้งหมด 47,696 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งแขวนลอย 19,066 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมด 8,550 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟีนอล 1,670 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจน 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแร่ธาตุต่างๆในปริมาณเล็กน้อย จากการศึกษาปัจจัยในการแยกพอลิเมอร์จากน้ำนึ่งปลาล์ม พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนระหว่างน้ำนึ่งปลาล์มกับเอทานอล 95% เท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง แยกขนาดพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ Sephadex G-25 ชะด้วยน้ำกลั่น พบว่า สารละลายพอลิเมอร์ถูกชะออกมา 2 พีค (peak) คือ พีค A (SC-L) และ พีค B (SC-S) ได้พอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Mp) ขนาด 1223 และ 2525 ดาลตัน ตามลำดับ ผลผลิตได้ yield เท่ากับ 65.31 และ 12.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Cordyceps dipterigena* BCC2073 เริ่มโดยการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ 6 ชนิด เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato dextrose broth (PDB) สามารถเจริญและผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้ดีที่สุด ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและพอลิเมอร์ 11.70 และ 3.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพในน้ำนึ่งปลาล์มที่เจือจาง (มีค่าซีไอดี 40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนโตรเจน 267 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ การปรับพีเอชเป็น 6.2 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อมีการเจริญและผลิตพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 23.43 และ 6.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงใน PDB 2 เท่า และสามารถลดค่าซีไอดีและปริมาณของแข็งทั้งหมดได้ 70.7 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่าพอลิเมอร์จากน้ำนึ่งปลาล์มทั้ง 2 ชนิด สามารถละลายได้ในน้ำ และ DMSO แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดที่ใช้ทดสอบ (อะซิโตรไนไตรล์ เมทานอล

อะซีโตน โพรพานอล ไคคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ และเฮกเซน) องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่สกัดจากน้ำนิ่งป่าลัม คือ SC-S และ SC-L ประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมด 241.29 และ 231.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า พอลิเมอร์ชนิด SC-S มีน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส ปริมาณเท่ากับ 41.29, 109.29 และ 26.14 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ ในขณะที่พอลิเมอร์ชนิด SC-L มีค่าเท่ากับ 5.86, 43.64 และ 7.75 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี FT-IR พบว่ามีหมู่ไฮดรอกซิล อีเทอร์ แอลเคน และคาร์บอนิล ซึ่งเป็นหมู่ของโมเลกุลน้ำตาล ดังนั้นจึงจัดเป็นพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ โดยพอลิเมอร์ชนิด SC-S และ SC-L มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Mp) เท่ากับ 1223 และ 6431 คาลตัน ตามลำดับ สำหรับพอลิเมอร์จากเชื้อรา *C. dipterigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าลัม (พอลิเมอร์ CD) สามารถละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดเช่นกัน แต่ละลายใน DMSO ได้บางส่วนโดยละลายได้สูงสุด 47 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีองค์ประกอบน้ำตาลทั้งหมด 205.33 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำตาลกลูโคส และอะราบิโนส เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ปริมาณ 147.41 และ 120.68 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ และมีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่ไฮดรอกซิล คาร์บอนิล อีเทอร์ และแอลเคน โดยมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Mp) เท่ากับ 20,064 คาลตัน

เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของพอลิเมอร์ชีวภาพทั้ง 3 ชนิด คือ พอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลัม SC-S และ SC-L และพอลิเมอร์จากเชื้อรา *C. dipterigena* BCC2073 โดยนำมาทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1, 2 และ 3 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และการย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase (1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กตามลำดับ พบว่า พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด สามารถทนต่อการย่อยที่สภาวะเป็นกรดสูงได้ดี โดยมีพอลิเมอร์ชีวภาพที่ไม่ถูกย่อยเหลืออยู่ 97.19, 97.8 และ 97.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase พบว่า พอลิเมอร์ที่ทนต่อการย่อยได้ดีคือ พอลิเมอร์ SC-S โดยมีพอลิเมอร์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 89.35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีศักยภาพเป็นพรีไบโอติกที่ดี โดยมีพอลิเมอร์ชีวภาพที่ไม่ถูกย่อยเหลือไปยังลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำพอลิเมอร์ชีวภาพชนิด SC-S มาทดสอบการส่งเสริมการเจริญแบคทีเรียโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus acidophilus* พบว่า เชื้อเหล่านี้ไม่สามารถใช้พอลิเมอร์ชีวภาพชนิด SC-S เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลให้การเจริญของเชื้อลดลง ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพทั้ง 3 ชนิด ในสารละลายดินขาว (kaolin) พบว่า พอลิเมอร์ชนิด SC-S ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนดีที่สุด และมีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมการตกตะกอน คือ พีเอช 6.0 มีการเติมแคทไอออนชนิด  $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ ) ความเข้มข้น 1.0

มิลลิโมลาร์ และใช้พอลิเมอร์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 5.22 (1/OD) เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชนิด SC-S โดยใช้วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (RSM) พบว่ามีค่าที่เหมาะสม ดังนี้ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  เท่ากับ 1.40 มิลลิโมลาร์ และค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 โดยให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด 7.45 (1/OD)

<b>Thesis Title</b>	Production and Properties of Biopolymers from Sterilizer Condensate of Palm Oil Mill and Fungus <i>Cordyceps</i> sp. Cultivated in Sterilizer Condensate of Palm Oil Mill
<b>Author</b>	Miss Jittapat Pensawat
<b>Major Program</b>	Biotechnology
<b>Academic Year</b>	2009

### Abstract

Sterilizer condensate is one of the three major sources of effluent from palm oil mill. It had the following characteristics; pH 5.05, 120,000 mg/l COD, 47,696 mg/l total solid with 19,066 mg/l suspended solid, 8,550 mg/l total sugar, 1,670 mg/l total phenol, 800 mg/l total nitrogen and contained trace amount of mineral salts. Effects of ethanol to sterilizer condensate ratio and temperature on yield of the biopolymers were studied. Among various ratio examined at room temperature, the ratio of 5.0 gave the highest yield. The biopolymers contained two subunits with the molecular weights (Mp) of 1223 (SC-S) and 2525 (SC-L) dalton determined by gel filtration chromatography with Sephadex G-25 column eluted by distilled water. The yields of SC-S and SC-L were 65.31% and 12.82%, respectively. The biopolymers were partially purified by dialysis. For production of polymer from *Cordyceps dipterrigena* BCC2073, the strain was cultivated in six different synthetic media for preparation of inoculum. The highest growth and biopolymer production (11.70 and 3.37 g/l, respectively) were obtained from using potato dextrose broth (PDB). Optimization studies on biopolymer production in the diluted sterilizer condensate (40,000 mg/l COD and 267 mg/l N) revealed the optimum condition at pH 6.2 and cultivation at room temperature with 150 rpm shaking speed. After 6 days cultivation, *C. dipterrigena* BCC2073 produced 6.53 g/l polymers and also reduce the organic matter with COD and total solid removal of 70.7 and 58 %, respectively. Studies on some properties of the partially purified biopolymers from sterilizer condensate SC-S and SC-L revealed that they were soluble in water and DMSO but insoluble in eight organic solvents tested (acetonitrile, methanol, acetone, propanol, dichloromethane, chloroform, diethyl ether and hexane). Characterization on

the biopolymers revealed that they were composed of total sugars at 241.29 and 231.70 mg/l, respectively. Results from HPLC, after acid hydrolysis, revealed that the biopolymers SC-S and the SC-L were composed of glucose, xylose and arabinose in the amount of 41.29, 109.29 and 26.14 mg/g biopolymer (SC-S) and 5.86, 43.64 and 7.75 mg/g biopolymer (SC-L), respectively. FT-IR spectra of the two biopolymers showed the presence of hydroxyl, ether, alkane and carbonyl groups which indicated a group of sugar molecule. So they were classified as polysaccharide polymers. The molecular weights (Mp) were 1223 and 6431 dalton, respectively. For biopolymer from *C. dipterigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate were soluble in water and partially soluble in DMSO. The maximum solubility of biopolymers in DMSO were 47 mg/l but insoluble in the eight organic solvents tested. The fungal polymer contained 205.33 mg/l total sugar, glucose and arabinose of 147.41 and 120.68 mg/g biopolymer, respectively. The biopolymers possessed the functional groups of hydroxyl, carbonyl, ether and alkane groups and had the molecular weights (Mp) of 20,064 dalton. Investigation for prebiotic properties of the three biopolymers by testing the resistance to acid (pH 1, 2 and 3) and enzymatic hydrolysis which performed *in vitro* simulated the condition of upper-gastrointestinal tract in humans. All biopolymers were resistant to acid (HCl buffer pH 1 for 4 h) in which 97.19, 97.80 and 97.46% of total carbohydrate remained for SC-S, SC-L and biopolymers from *C. dipterigena* BCC2073, respectively. For the resistant to pancreatic  $\alpha$ -amylase, the SC-S biopolymer showed highly persistent to enzymatic hydrolysis (1 unit/ml at 37°C for 6 h) with 82.16% of total carbohydrate remained. The effect of SC-S biopolymers on the growth enhancement of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* under anaerobic fermentation was studied *in vitro*. Probiotic bacteria could not utilize polymers as carbon source. Flocculating activity of the biopolymers in the kaolin suspension was markedly stimulated by the addition of trivalent cation under the optimum condition at room temperature. The optimum values were 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 2 mg/l SC-S, and the initial pH of 6.0. The effect of interaction of these parameters on flocculating activity of SC-S polymer was studied using the response surface methodology (RSM). The highest flocculating activity of 7.45 (1/optical density) was obtained with 5.0 mg/l of biopolymer in combination with 1.40 mM FeCl<sub>3</sub> (Fe<sup>+3</sup>) at pH 5.5.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
Abstract.....	(6)
กิตติกรรมประกาศ.....	(8)
สารบัญ.....	(9)
LIST OF TABLES.....	(16)
LIST OF FIGURES.....	(18)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
1. แหล่งที่มาและองค์ประกอบน้ำนิ่งปาล์ม.....	2
1.1 แหล่งที่มาของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม.....	2
1.2 ปริมาณ คุณลักษณะ และองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์ม.....	4
2. เฮมิเซลลูโลส.....	9
3. ความหมายและคุณสมบัติของพรีไบโอติก.....	13
4. ชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์.....	14
4.1 แลคทูโลส (Lactulose).....	14
4.2 อินนูลิน (Inulin) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo- oligosaccharide, FOS).....	14
4.3 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galactooligosaccharides, GOS)...	15
4.4 โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (Soybean oligosaccharides (SOR)).....	15
4.5 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS).....	16
4.6 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomaltooligosaccharides, IMO)..	16
4.7 กลูคูโอลิโกแซคคาไรด์ (Glucooligosaccharides, GOS).....	16
4.8 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylooligosaccharides, XOS).....	17
	(9)



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5. ประโยชน์ของฟรุ๊ตโบโอดีค.....	17
5.1 การป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่.....	17
5.2 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค.....	18
5.3 เพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ.....	18
5.4 ลดระดับคอเลสเตอรอลและไขมันในเลือด.....	19
5.5 ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน.....	19
6. เชื้อรา <i>Cordyceps</i> sp.....	20
7. พอลิเมอร์ชีวภาพ.....	24
7.1 พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides).....	24
7.1.1 จำแนกตามกระบวนการสังเคราะห์.....	24
7.1.2 จำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิเมอร์.....	25
7.1.2.1 พอลิเมอร์ที่มีประจุลบ.....	25
7.1.2.2 พอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นกลาง.....	25
7.1.2.3 พอลิเมอร์ที่มีประจุบวก.....	25
7.1.3 จำแนกตามโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ.....	25
7.1.3.1 โฮโมพอลิแซคคาไรด์.....	25
7.1.3.2 เฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์.....	25
7.1.3.3 พอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์..	25
7.1.3.4 พอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์	26
7.2 พอลิแซคคาโรเปปไทด์ (Polysaccharopeptides).....	28
8. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรา <i>Cordyceps</i> sp.....	29
8.1 ผลของแหล่งคาร์บอน.....	31
8.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน.....	31
8.3 แหล่งแร่ธาตุ.....	31
8.4 ผลของอุณหภูมิ.....	32
8.5 ผลของพีเอช.....	32

## สารบัญ (ต่อ)

9.	สารตกตะกอนชีวภาพ (Biofloculant).....	32
9.1	หลักการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพ.....	33
9.2	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของสารตกตะกอนชีวภาพ.....	37
9.2.1	น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของสารตกตะกอนชีวภาพ.....	37
9.2.2	พีเอช.....	38
9.2.3	อุณหภูมิ.....	38
9.2.4	ชนิดของอ็อกซิเจนและความเข้มข้นของโลหะ.....	38
9.3	การประยุกต์ใช้สารตกตะกอนชีวภาพ.....	39
9.3.1	ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย.....	39
9.3.2	ใช้ในการแยกน้ำมันที่เป็นอิมัลชันอยู่ในน้ำ.....	39
9.3.3	ใช้ในการเก็บเกี่ยวเซลล์และเศษเซลล์ออกจากน้ำหมัก.....	40
	วัตถุประสงค์.....	40
2	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	41
	วัสดุ.....	41
	อุปกรณ์.....	42
	วิธีการวิเคราะห์.....	43
	1. การวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง (Mycelia dry weight).....	43
	2. การวัดการเจริญของเชื้อ.....	43
	3. การหาปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพที่เชื้อผลิตได้.....	44
	4. การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆและ น้ำตาลทั้งหมด.....	44
	5. การวิเคราะห์แร่ธาตุชนิดต่าง ๆ.....	44
	6. การวิเคราะห์ค่าซีไอดี, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอย, สารฟิ นอล และไนโตรเจนทั้งหมด.....	44
	7. การวัดค่ากิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยของสารตกตะกอน ชีวภาพ.....	45

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีการทดลอง.....	45
1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	45
1.1 การเตรียมน้ำนิ่งป่าลุ่มเบื้องต้น (pretreat).....	45
1.2 ผลของอัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	45
1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์.....	46
1.4 การเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	46
2. การแยกขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	46
3. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ ของเชื้อรา <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073.....	46
4. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	47
4.1 การวิเคราะห์ลักษณะของน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	47
4.2 การเลี้ยงเชื้อราในน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	47
4.2.1 การคัดเลือกระดับความเข้มข้นน้ำทิ้งในอาหารแข็งน้ำนิ่งป่าลุ่ม	47
4.2.2 ผลของความเข้มข้นสารอินทรีย์ในน้ำนิ่งป่าลุ่ม.....	47
4.2.3 การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา.....	48
4.2.4 การเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าลุ่มและการ ทำบริสุทธิ์บางส่วน.....	48
5. ศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน.....	49
5.1 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์.....	49
5.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์.....	49
5.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC).....	49
5.4 องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพ (การวิเคราะห์เชิง ปริมาณ).....	50
5.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	50

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid assay.....	50
5.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลางด้วยวิธี Anthrone reaction.....	50
5.4.4 การวิเคราะห์หาน้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) ด้วยวิธี Ferric-orninol assay.....	50
5.4.5 การวิเคราะห์หาน้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ด้วยวิธี L-cysteine hydrochloride assay.....	51
5.4.6 การวิเคราะห์หากรดยูโรนิก วิเคราะห์โดยวิธี Carbazole-sulfate reaction.....	51
5.5 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์.....	51
5.5.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC).....	51
5.5.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	52
6. คุณสมบัติการเป็นสารฟรีไบโอติก.....	52
6.1 การทดสอบการทนต่อการย่อยในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร.....	52
6.2 การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic $\alpha$ -amylase.....	53
6.3 ผลของการใช้พอลิเมอร์ต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก.....	53
7. คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนในสารละลายดินขาว.....	54
8. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพ.....	54
8.1 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ชีวภาพ.....	54
8.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออลอนโลหะ.....	55
8.3 ผลของพีเอช.....	55

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
9. สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพโดยใช้ Response surface methodology (RSM).....	55
3 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	58
1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม.....	58
1.1 ผลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งปาล์ม.....	58
1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์.....	59
2. การแยกขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม.....	60
3. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073.....	62
4. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรา <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 ในน้ำนิ่งปาล์ม.....	67
4.1. ลักษณะและองค์ประกอบของน้ำนิ่งปาล์ม.....	67
4.2 การเลี้ยงเชื้อราในน้ำนิ่งปาล์ม.....	68
4.2.1 การคัดเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งในอาหารแข็งน้ำนิ่งปาล์ม...	68
4.2.2 ผลของความเข้มข้นสารอินทรีย์ในน้ำนิ่งปาล์ม.....	69
4.2.3 การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา.....	72
4.2.4 การเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์มและการทำบริสุทธิ์บางส่วน.....	75
5. ศึกษาลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งปาล์มและจากเชื้อรา <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน.....	76
5.1 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์ชีวภาพ.....	76
5.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์.....	78
5.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC).....	81

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4 องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพ.....	82
5.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์	83
5.5.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC).....	83
5.5.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	85
6. คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก.....	88
6.1 การเตรียมสารพอลิเมอร์.....	88
6.2 ผลของการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรด.....	89
6.3 ผลของการย่อยสารพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์ human pancreatic $\alpha$ -amylase...	92
6.4 ผลของการใช้พอลิเมอร์เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก.....	95
7. คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพในสารละลายดินขาว.....	104
8. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพในสารละลายดินขาว	105
8.1 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์.....	105
8.2 ผลของชนิดไอออน โลหะ.....	107
8.3 ผลของพีเอช.....	111
9. สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพโดยใช้ Response surface methodology (RSM).....	112
4 บทสรุป.....	121
ข้อเสนอแนะ.....	123
เอกสารอ้างอิง.....	124
ภาคผนวก.....	140
ประวัติผู้เขียน.....	161

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. The average values of raw material and waste generated from five selected factories in Thailand (2002).....	5
2. Summary of the emissions associated with the crude palm oil production.....	5
3. Characteristics of effluent from various steps during palm oil extraction and mixed effluent.....	7
4. Characteristics and distribution of chemical constituents of palm oil mill effluent (POME).....	8
5. Compounds isolated from <i>Cordyceps</i> species and biological activity.....	22
6. Chemical structures of homopolysaccharide.....	26
7. Chemical structures of heteropolysaccharides.....	27
8. Established applications of microbial exopolysaccharides.....	30
9. Some of the bioflocculant-producing microorganisms.....	34
10. Independent variables and their factor levels.....	56
11. Central composite experimental design matrix defining polymer concentration ( $X_1$ ), cation concentration ( $X_2$ ) and pH ( $X_3$ ) on flocculation activity.....	57
12. Effect of ethanol to sterilizer condensate of palm oil mill ratio and temperature on yield of the polymers obtained after precipitation.....	60
13. Effect of different medium on the mycelial and biopolymer production by submerged culture of <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073.....	66
14. Characteristics of sterilizer condensate effluent from palm oil mills.....	68
15. Effect of organic matter concentration in sterilizer condensate of palm oil mill effluent on growth during cultivation of <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 on palm oil mill effluent agar at $30\pm 2^\circ\text{C}$ for 16 days.....	71
16. Glucosamine content and mycelial biomass during cultivation of <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 in diluted sterilizer condensate.....	75

## LIST OF TABLES (Continued)

<b>Table</b>	<b>Page</b>
17. Solubility of biopolymers from sterilizer condensate (SC-S, SC-L) and <i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate.....	77
18. The dominant spectrum and wave number of partially purified biopolymers from sterilizer condensate SC-S, SC-L and <i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073 analysed by FT-IR spectroscopy.....	80
19. Molecular weight and polydispersity of biopolymers from sterilizer condensate SC-S, SC-L and <i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073.....	82
20. Carbohydrates components of the partially purified biopolymer.....	83
21. Flocculating activity of biopolymer from sterilizer condensate and <i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate in kaolin clay suspension. Different letters were significant differences ( $P < 0.05$ ).....	104
22. The central composite experimental design (CCD) matrix defining biopolymer concentrations, $FeCl_3$ concentrations and pH and results on flocculating activity where $X_1$ = biopolymer concentration, $X_2$ = $FeCl_3$ and $X_3$ = pH.....	115
23. Quadratic model coefficient estimated by multiples linear regression (significance of regression coefficients).....	116
24. ANOVA for response surface quadratic model.....	116
25. Confirmation experimental design.....	118
26. Optimization for flocculating activity by using the polymer from sterilizer condensate (SC-S) as flocculant.....	119
27. Composition of the partially purified biopolymer.....	122
<b>Table-Appendix</b>	<b>Page</b>
1. Hydrolysis of the biopolymers in HCl buffer solution with pH 1, 2 and 3.....	157
2. Enzymatic hydrolysis of biopolymer by $\alpha$ -amylase.....	157
3. Growth of probiotic used biopolymers as carbon sources in minimal medium.....	158



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Palm oil milling process.....	3
2. Principal structure of galactoglucomannans in softwood.....	10
3. Principal structure of arabinoglucuronoxylan in softwood.....	11
4. Principal structure of glucuronoxylan in hardwood.....	11
5. The structural representation of glucomannan from konjac.....	11
6. Structural details of AG-1. The galactose backbone is shown with the terminal glucuronic acids and the infrequently occurring single arabinose side chain.....	12
7. Arabinoxylan from grasses.....	12
8. Molecular structure of ferulic acid.....	12
9. Schematic showing the possible mechanisms of prebiotic action. Solid lines indicate relatively well-established modes of action. Dotted lines indicate less well-established or speculative modes of prebiotic action.....	13
10. The life cycle of <i>Cordyceps</i> sp.....	21
11. Structures of compounds from <i>Cordyceps nipponica</i> (1) cordypyridones A ( <i>N</i> -Hydroxy-2-pyridones), (2) B ( <i>N</i> -Methoxy-2-pyridones).....	21
12. Mechanism of bioflocculation.....	37
13. Effect of ethanol to sterilizer condensate of palm oil mill ratio and temperature on yield of the polymers obtained after precipitation at room temperature (●) and 4°C (○). The results were expressed as the average of triple determinations with and error bars indicate standard deviations.....	59
14. The appearance characteristics of polymers from sterilizer condensate of palm oil mill after precipitation with ethanol (a) and after freeze drying (b).....	61
15. Gel filtration chromatography pattern of crude polymer (P-5.0) isolated from sterilizer condensate of palm oil mill. Sample were loaded onto a Sephadex G-25 medium column, resolved at a flowrate of 0.4 ml/min, and collected as 1 ml fractions. Peak A: large molecule, peak B: small molecule. The solid line represents the absorbance at 620 nm for carbohydrates.....	62

## LIST OF FIGURES (Continued)

Figure	Page
16. Time courses of mycelial growth (a), exo-biopolymer (b) and final pH (c) production by <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 in synthetic media. PDBY medium (◆); YM medium (■); SDB medium (○); MCM-1 medium (△); MCM-2 medium (▲); SSY medium (●).....	65
17. Comparison on growth of <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in different organic matter concentration of sterilizer condensate of palm oil mill effluent on agar plates at room temperature (30±2°C) for 16 days where (a) dilution at 1:0, (b) at 1:1, (c) at 1:2 and (d) at (1:3) and each dilution has a COD concentration equal 120, 60, 40 and 30 g/l respectively.....	71
18. Time course of growth (●) and biopolymer (▲) production by <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in diluted sterilizer condensate with COD of 40 g/l, pH 6.2. Residual sugar (■), %COD removal (□), glucosamine content (○) and pH (◆). Values represented means of two independent experiments and error bars indicate standard deviations.....	74
19. The fibrous characteristics of polymer from <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate after precipitation with ethanol (a) and after freeze drying (b).....	76
20. The infrared spectra of the partially purified biopolymer from sterilizer condensate of palm oil mill; small molecule (SC-S) (a) and large molecule (SC-L) (b), and <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (c).....	79
21. TLC Identification of sugar composition in biopolymer obtained from sterilizer condensate SC-S (a), SC-L (b) and produced by <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (c) hydrolyzed with 3 N TFA using Rhamnose (d), Xylose (e), Fructose (f), Arabinose (g), Glucose (h), Galactose (i) and Mannose (j) as a reference sugars.....	84

## LIST OF FIGURES (Continued)

Figure	Page
22. Calibration curves of sugars by HPLC analysis.....	86
23. HPLC chromatograms of hydrolysate of biopolymer from sterilizer condensate (SC-S) (a), and (SC-L) (b), and hydrolysate of biopolymer from <i>C. dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (c).....	87
24. Total sugar and reducing sugar in polymer from sterilizer condensate SC-S (A), SC-L (B), <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 (C).....	88
25. Hydrolysis of biopolymer from SC-S (●), SC-L (■) and biopolymer from <i>C. dipterrigena</i> BCC2073 (◆) in HCl buffer pH 1 (a), 2 (b) and 3 (c). The results are mean values of triplicates and error bars indicate standard deviations	90
26. Enzymatic hydrolysis of two biopolymers from sterilizer condensate SC-S (A), SC-L (B) and <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 (C)	95
27. Percentage of hydrolysis (reducing sugar/(total sugar content – initial reducing sugar) x 100) of the extract by using HCl at pH 1 (▣) and human pancreatic α-amylase (▤) of ethanolic extracts from sterilizer condensate; SC-S (A), SC-L (B) and <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (C).....	95
28. The growth of probiotic in minimal medium containing polymer from sterilizer condensate (SC-S) (●), glucose (■) as a carbon source and without carbon source (▲); <i>L. acidophilus</i> (a) and <i>L. plantarum</i> (b). The results are mean values of triplicates and error bars indicate standard deviations.....	97
29. Percentage of carbon sources utilization by <i>L. acidophilus</i> (a) and <i>L. plantarum</i> (b) in minimal medium containing polymer from sterilizer condensate SC-S (●) and glucose (■) as a carbon source and without carbon source (▲) at 37 °C for 72 hours and residual sugar concentration for polymer (○), glucose (□) and without carbon source (△). The results are mean values of triplicates error bars indicate standard deviations.....	100

## LIST OF FIGURES (Continued)

Figure	Page
30. The pH change in anaerobic fermentation by <i>L. acidophilus</i> (a) and <i>L. plantarum</i> (b) in minimal medium using polymer from sterilizer condensate SC-S (●), glucose (■) as carbon sources and without carbon source (▲) at 37 °C for 72 hours. The results are mean values of triplicates and error bars indicate standard deviations.....	103
31. Effect of biopolymer concentration on flocculating activity using biopolymer from SC-S (○), SC-L (●) and <i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC2073 (*) at various biopolymer concentrations; 2, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100 mg/L in kaolin clay suspension (5 g/L) at pH 7.0 supplemented with 4.5 mM CaCl <sub>2</sub> .....	106
32. Effect of monovalent (a), divalent (b) and trivalent (c) cation concentrations on the flocculating activity of biopolymer SC-S. The flocculating activity was carried out using kaolin clay suspension with the addition of various cations at pH 7.0. Symbols; KCl (●), NaCl (○), CaCl <sub>2</sub> (□), CuCl <sub>2</sub> (■), FeSO <sub>4</sub> (△), MgSO <sub>4</sub> (▲), MgCl <sub>2</sub> (X), AlCl <sub>3</sub> (◆) and FeCl <sub>3</sub> (◇).....	110
33. Effect of pH (2.0 to 10.0) on the flocculating activity using biopolymer SC-S (5 mg/L) and 1 mM FeCl <sub>3</sub> .....	112
34. Response surface plot for flocculating activity of polymer from sterilizer condensate (SC-S) to determine the effect of biopolymer concentration and pH (a), and the effect of FeCl <sub>3</sub> concentration and pH (b).....	117
<b>Figure-Appendix</b>	
1. Standard curve of phenol solution.....	147
2. Standard curve of xylose solution (a) and glucose solution (b) analyzed by ferric-orcinol assay and L-cysteine hydrochloride assay respectively.....	149
3. Standard curve of standard solution glucose analyzed by Anthrone method.....	150

## LIST OF FIGURES (Continued)

Figure-Appendix	Page
4. Standard curve of glucuronic acid lactone.....	151
5. Standard curve of reducing sugar analyzed by Copper-bicinchoninate method.....	152
6. Standard curve of reducing sugar analyzed by dinitrosalicylic acid method.....	153
7. Standard curve of total sugar analyzed by phenol-sulfuric acid method.....	154
8. Standard curve of glucosamine analyzed by method for the quantitative determination of hexosamines according to Elson and Morgan.....	155
9. GPC chromatogram of biopolymer from sterilizer condensate precipitated with 95% ethanol at ratio 5.0.....	159
10. GPC chromatogram of partially purified biopolymer SC-L .....	159
11. GPC chromatogram of biopolymer from <i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073 cultivated in diluted sterilizer condensate after precipitation with 95% ethanol.....	160

# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และอุตสาหกรรมปาล์ม น้ำมันยังมีความสำคัญยิ่งต่อเศรษฐกิจของภาคใต้ มีการปลูกกันมากที่จังหวัดกระบี่, สตูล, สุราษฎร์ธานีและชุมพร ในปี พ.ศ. 2551 มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 3.50 ล้านไร่ และมีจำนวนโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 52 โรง (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2552) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน (wet process) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้น้ำในการสกัดน้ำมัน มีประมาณ 75-80% ของการผลิตน้ำมันปาล์ม (H-Kittikun *et al.*, 2000) และเป็นสาเหตุให้มีน้ำเสีย เกิดขึ้นในกระบวนการสกัด โดยมีปริมาณเฉลี่ย 0.87 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด ซึ่งเป็น ปริมาณน้ำเสียที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตได้แก่ น้ำนึ่งปาล์ม น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ หรือเครื่องแยก (separator) และเครื่องกำจัดน้ำออกจากน้ำมันในขั้นตอนสุดท้าย (Prasertsan and Prasertsan, 1996)

น้ำนึ่งปาล์มหรือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีปริมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะลายปาล์ม สด (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล มีค่าพีเอชในช่วง 4.8-5.3 มี สารอินทรีย์ในรูปบีโอดี (BOD) 22,880-41,985 มิลลิกรัมต่อลิตร และในรูปของซีโอดี (COD) 45,360-80,146 มิลลิกรัมต่อลิตร ในโตรเจนในรูปแอมโมเนีย 7.7-66.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และในรูป ของสารอินทรีย์ 22.4-1,287 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาที่มีปริมาณสารอินทรีย์อยู่สูงและผ่านการให้ ความร้อนสูงจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์แทนการปล่อยทิ้งสู่ระบบบำบัดน้ำเสียโดยตรง ซึ่งไม่ มีผลตอบแทนและอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาวิจัยเบื้องต้น พบว่า น้ำนึ่งปาล์มมีส่วนผสมของพอลิเมอร์ชนิด เสมิเซลลูโลสซึ่งละลายออกจากทะลายปาล์มและผลปาล์มระหว่างการนึ่งปาล์มที่อุณหภูมิสูง เสมิเซลลูโลสดังกล่าวสามารถสกัดออกมาได้ด้วยวิธีการทางเคมี ซึ่งนอกจากจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มี มูลค่าแล้ว ยังสามารถลดความสกปรก (ค่าบีโอดี) ของน้ำเสียของโรงงานได้ด้วย นอกจากนี้ในการ บำบัดน้ำเสีย พบว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ดี เนื่องจากน้ำเสียมีพีเอชเป็นกรด (พีเอช 4.5-5.5) และ เชื้อราบางสายพันธุ์สามารถผลิตพอลิเมอร์ออกมาในระหว่างการเจริญได้ด้วย และมีรายงาน ผลการวิจัยว่า เสมิเซลลูโลสหรือสารไซโตโอลิโกแซคคาไรด์ของพอลิเมอร์นี้มีคุณสมบัติในการเป็น สารพรีไบโอติก สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเสริมสุขภาพได้ (Crittenden and Playne

1996; Vazquez *et al.*, 2000) ส่วนพอลิเมอร์จากเชื้อราก็มีรายงานที่มีผู้วิจัยพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งใช้ในทางการแพทย์ได้ (Isaka and Tanticharoen, 2001; Isaka *et al.*, 2005)

## การตรวจเอกสาร

### 1. แหล่งที่มาและองค์ประกอบน้ำมันปาล์ม

#### 1.1 แหล่งที่มาของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม

น้ำเสียส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มมีปริมาณ 1.0-1.3 ลูกบาศก์เมตรต่อ 1 ตันทะลายปาล์มสด คิดเป็น 50-79% ของปริมาณน้ำเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์มทั้งหมดที่เกิดขึ้น (Chavalparit *et al.*, 2006) โดยสามารถสรุปกระบวนการผลิตได้เป็น 3 ประเภท (H-Kittikun *et al.*, 2000) คือ

1. การผลิตแบบไมใช้น้ำหรือแบบแห้ง โดยใช้ความร้อนในการอบผลปาล์มได้จาก ฟืน ซึ่งใช้เวลานานกว่าการอบด้วยไอน้ำมาก วิธีนี้จึงเหมาะสมกับโรงงานขนาดเล็ก ได้น้ำมันดิบที่ เรียกว่า น้ำมันกะเทย คือ น้ำมันที่มีการผสมทั้งน้ำมันจากส่วนเปลือกและน้ำมันในเมล็ด วัสดุเศษเหลือทิ้งของโรงงานประเภทนี้ คือ กากปาล์มเพียงอย่างเดียวจะไม่มีน้ำเสียออกจากระบบการผลิต

2. กระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม (Frying process) คือกระบวนการที่ทอดผลปาล์มในน้ำมันภายใต้สภาวะสุญญากาศจากนั้นนำผลปาล์มที่ได้เข้าเครื่องหีบแบบเกลียว ซึ่ง กระบวนการผลิตวิธีนี้น้ำมันที่ได้จะเป็นน้ำมันผสมกับน้ำมันเมล็ดใน ข้อดีของกระบวนการผลิตวิธี นี้คือไม่เกิดน้ำเสียจากกระบวนการผลิต

3. กระบวนการผลิตแบบใช้น้ำ (Wet process) หรือแบบมาตรฐาน โดยมีการใช้น้ำ (ไอน้ำ) ในการอบทะลายปาล์ม หรือผลปาล์ม และในกระบวนการสกัดน้ำมันแบ่งย่อยออกเป็น 2 ลักษณะ คือ แบบที่ใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมันแบบ 3 เฟส (phase) ที่เรียกว่า decanter และแบบที่ใช้ เครื่องแยกน้ำมันแบบ 2 เฟส ที่เรียกว่า separator แหล่งที่มาของน้ำทิ้งส่วนใหญ่มาจาก 2 ขั้นตอน ได้แก่ น้ำทิ้งจากหม้อนึ่งอบผลปาล์ม และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ในกระบวนการผลิตนี้จะมี ข้อเสียคือมีปริมาณน้ำเสียจากกระบวนการผลิตสูง

สำหรับขั้นตอนทั่วไปของการสกัดน้ำมันปาล์ม (Figure 1) แบบใช้น้ำเริ่มจากการอบทะลายปาล์มสดด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 40-60 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ประมาณ 40-60 นาที การอบทะลายปาล์มสดนอกจากจะช่วยให้ผลปาล์มนุ่มหลุดจากทะลายปาล์ม ได้ง่ายขึ้นแล้วยังเป็นการยับยั้งปฏิกิริยาไลโปไลซิสที่จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในผลปาล์ม จากนั้นได้ส่งทะลายปาล์มที่ผ่านการอบแล้วไปยังเครื่องแยกผลปาล์ม แล้วส่งต่อผลปาล์มเข้าเครื่อง

ข่อยผลปาล์ม ขณะข่อยผลปาล์มมีการเติมน้ำลงไปด้วยเล็กน้อย จากนั้นป้อนเข้าเครื่องหีบแบบอัดเกลียว (screw press) เพื่อแยกน้ำมันออกจากเมล็ดในและเส้นใย น้ำมันที่ได้จากเครื่องหีบ กรองแยกเส้นใยผ่านตะแกรงแบบสั้น จากนั้นแยกกรวดทรายแบบไฮโดรไซโคลอน น้ำมันส่วนนี้จะเข้าสู่เครื่อง

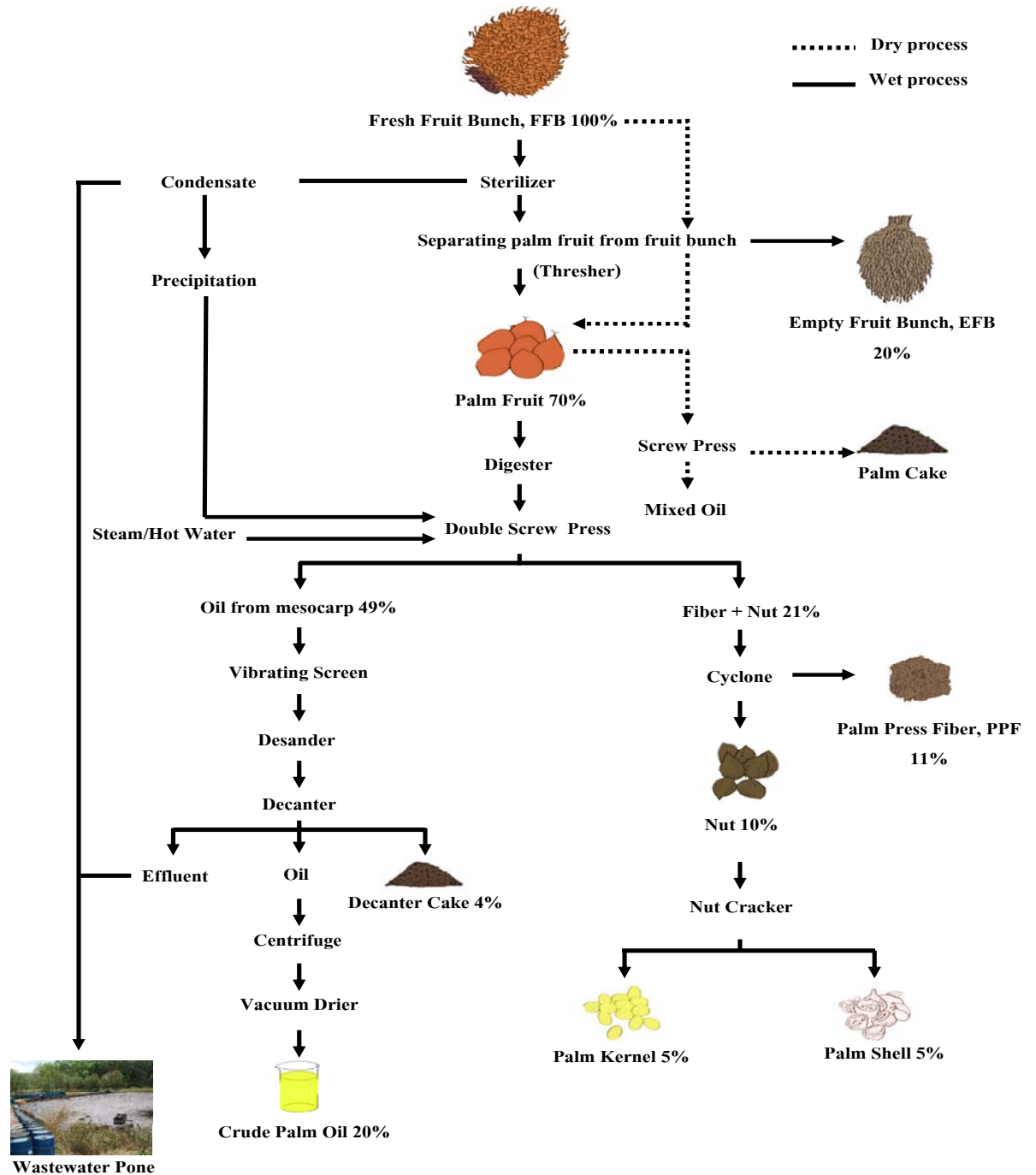


Figure 1. Palm oil milling process

ที่มา : ดัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐธรรม์ และคณะ (2533)



เหยียงแยกความเร็วสูงเพื่อกำจัดอนุภาคของแข็งก่อนผ่านการไล่ความชื้นและนำไปเก็บในถังเก็บเพื่อรอการทำบริสุทธิ์หรือส่งจำหน่ายโรงงานกลั่นน้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป (อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และคณะ, 2537)

นอกจากนี้ทั้งแล้ว กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มยังก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์ม, เส้นใย และ กะลาปาล์ม โดยมีปริมาณเท่ากับ 3.96, 2.31 และ 1.0 (ตันต่อไร่ต่อปี) ตามลำดับ และปริมาณน้ำเสียเท่ากับ 10.56 ตันต่อไร่ต่อปี (Table 1) (Chavalparit *et al.*, 2006)

## 1.2 ปริมาณ คุณลักษณะ และองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Chavalparit และคณะ (2006) ประมาณการปริมาณน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในปี 2545 ประมาณ 113,000 ตันต่อปี จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำจะมีน้ำที่ออกมาในปริมาณมาก อัตราการใช้น้ำในกระบวนการผลิตเฉลี่ย 0.5-1.0 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด และปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นประมาณ 66.7-100% ของปริมาณน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตทั้งหมด น้ำเสียส่วนใหญ่มาจากสองขั้นตอน คือ น้ำนึ่งปาล์ม หรือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (Sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์หรือเครื่อง separator โดยน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะลายปาล์ม ปริมาณน้ำทิ้งคิดเป็น 2.5-3.0 เท่าของปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533)

กระบวนการผลิตน้ำมันดิบไม่ต้องใช้สารเคมีในกระบวนการผลิต แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีปัญหาสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้น เช่น มีน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปริมาณสูงซึ่งมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่สูง โดยในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตจะมีของเสียเกิดขึ้นหลายชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน (Table 2)

น้ำเสียส่วนใหญ่มาจากกระบวนการผลิตแบบใช้น้ำ (wet process) โดยน้ำเสียส่วนใหญ่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มซึ่งมีปริมาณ 1.0-1.3 ลูกบาศก์เมตรต่อ 1 ตันทะลายปาล์มสด คิดเป็น 50-79 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์มทั้งหมดที่เกิดขึ้น ในปี พ.ศ. 2546 มีรายงานว่าปริมาณน้ำเสียเกิดขึ้น 2.56 ล้านลูกบาศก์เมตรมีค่าบีโอดี 118 ล้านกิโกลกรัม ซึ่งค่าบีโอดีที่เกิดขึ้นเทียบเท่ากับน้ำเสียจากชุมชนที่มีประชากรประมาณ 5 ล้านคน (ต่อปี) (Chavalparit *et al.*, 2006) ดังนั้นในกระบวนการผลิตจึงได้มีการหมุนเวียนน้ำมาใช้ในการผลิตเพื่อลดปริมาณน้ำเสียที่จะปล่อยออกจากกระบวนการผลิต

Table 1. The average values of raw material and waste generated from five selected factories in Thailand (2002)

	Wet weight (ton/ha/year)	Dry weight (ton/ha/year)
Fresh fruit bunch	16.5	10.6
Fiber	2.31	1.6
Shell	1.0	0.9
Oil yield	2.75	2.75
Wastewater	10.56	0.64
Oil extraction (%)	16.8	-
Empty fruit bunch	3.96	2.6
Oil content in oil palm fruit (%)	17	-

ที่มา : Chavalparit และคณะ (2006)

Table 2. Summary of the emissions associated with the crude palm oil production

Process	Air emission	Wastewater (WW)	Solid waste
Sterilization	Steam blow down	High organic WW	-
Oil extraction	-	-	Fiber, shell
Loading ramp	-	Oil contaminated WW	-
Oil clarification	-	High organic WW	Decanter cake
Oil purification	Vapor	High organic WW	-
Bunch stripping	-	-	Empty fruit bunch
Steam generation	Particulate matter	-	Ash

Note: WW, Wastewater

ที่มา : ดัดแปลงจาก Chavalparit และคณะ (2006)

จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือจำนวนมากได้แก่ ทะลายเปล่า เส้นใยปาล์มกะลาปาล์ม กากเนื้อผลปาล์ม และน้ำทิ้ง ซึ่งความแตกต่างของวัสดุเศษเหลือขึ้นกับคุณภาพวัตถุดิบด้วย โดยเฉพาะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีปริมาณมากถึง 0.87 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเปรียบเทียบปริมาณน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 4 โรงงานในภาคใต้ พบว่าโรงงานที่ใช้เครื่อง separator มีปริมาณน้ำทิ้งต่อตันทะลายปาล์มสดสูงกว่าโรงงานที่ใช้เครื่องดีแคนเตอร์ ในน้ำทิ้งมีมวลสารในรูป ซีโอดี บีโอดี ของแข็งแขวนลอย และน้ำมันในระดับสูง มีสีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลปนดำ พีเอช 4-5 (Table 3) แร่ธาตุชนิดต่างๆที่พบได้ในน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม แสดงใน Table 4 เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่ามีค่าที่สูงเพราะมีร้อยละของไนโตรเจนต่ำประมาณร้อยละสองของน้ำหนักแห้ง แต่เนื่องจากน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มมีสารอาหารสูง จึงมีการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และใช้เป็นแหล่งผลิตแก๊สชีวภาพ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ, 2542)

Hartley (1977) กล่าวว่า กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มไม่มีการเติมสารเคมีอื่นใดนอกจากน้ำ ดังนั้นสีน้ำตาลของน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างของสารอินทรีย์ต่างๆ ในปาล์มน้ำมันอันเนื่องจากการให้ความร้อนในขั้นตอนการนึ่งปาล์ม และการแตกตัวขององค์ประกอบ จากขั้นตอนการหีบอัดรงควัตถุพวกแอนโทไซยานิน (anthocyanins) และแคโรทีน (carotene) ที่มีอยู่ในผลปาล์มถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมันและไอน้ำเนื่องจากเซลล์ผลปาล์มถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบสารประกอบพวกโพลีฟีนอล แทนนิน และโพลีแอลกอฮอล์ โดยน้ำทิ้งจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีปริมาณเพคตินและโพลีฟีนอลเท่ากับ 5.7 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Barker and Worgan, 1981 อ้างโดย พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2544) การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการบำบัดทางชีวภาพแล้วพบว่า มีฟีนอล 4.5-5.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอชประมาณ 9.4 (จินตนา แก้วบริสุทธิ์, 2541 อ้างโดย โสภการรณ รัตนพันธุ์, 2547) และในองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มยังพบสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้ง น้ำตาล เพคติน และเพนโตซาน (pentosan) รวมทั้งโปรตีนทั้งในส่วนน้ำทิ้งและสลัดจ์ ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่พบในส่วนของสลัดจ์ร้อยละ 2.5 และ 12.2 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ (Hwang *et al.*, 1978)

Table 3. Characteristics of effluent from various steps during palm oil extraction and mixed effluent

Parameter	Mixed effluent	Sterilizer condensate	Decanter effluent
Color	Dark-brown	Brown	Brown or dark brown
pH	4.05 – 4.62	4.84 – 5.35	4.61 – 4.89
BOD	54,750 – 60,000	22,800 – 41,985	21,000 – 45,375
COD	80,523 – 115,934	45,360 – 80,146	38,246 – 67,567
Alkalinity	68 – 200	37 – 1,576	86 – 480
Total solid	49,063 – 88,508	26,367 – 76,733	25,634 – 47,242
Volatile acid	3,128 – 5,870	998 – 7,125	1,838 – 2,273
Volatile solid	42,063 – 81,872	24,415 – 67,635	23,056 – 39,617
Oil and Grease	16 – 2,449	20 – 1,165	4.7
Suspended solid	18,500 – 52,000	2,600 – 6,100	2,900 – 20,300
Nitrogen			
- Ammonia	27 – 61	7 – 66.3	22 – 23
- Organic	551 – 1,172	22 – 1,287	518

All parameter units are mg/l except pH

ที่มา : ดัดแปลงจาก พูนสุข ประเสริฐธรรม์ และคณะ (2533)

Table 4. Characteristics and distribution of chemical constituents of palm oil mill effluent (POME)

Parameter	Concentration
pH	4.7
Oil and grease (mg/l)	4,000
Biological oxygen demand (BOD)(mg/l)	25,000
Chemical oxygen demand (COD) (mg/l)	50,000
Total solids (mg/l)	40,500
Suspended solids (mg/l)	18,000
Ammonia cal nitrogen (mg/l)	35
(a) Mineral (mg/l)	3,560
Phosphorous	180
Potassium	2,270
Magnesium	615
Calcium	439
Boron	7.6
Iron	46.5
Manganese	2.0
Copper	0.89
Zinc	2.3
(b) Carbohydrate constituents (mg/l)	3,900
Glucose	140
Reducing sugars	1,450
Starch	360
Pectin	328
Others	1,622
(c) Protein (mg/l)	2,830
Amino acids	Not available
Peptides	Not available
Others	Not available

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ahmad และคณะ (2007)

## 2. เฮมิเซลลูโลส

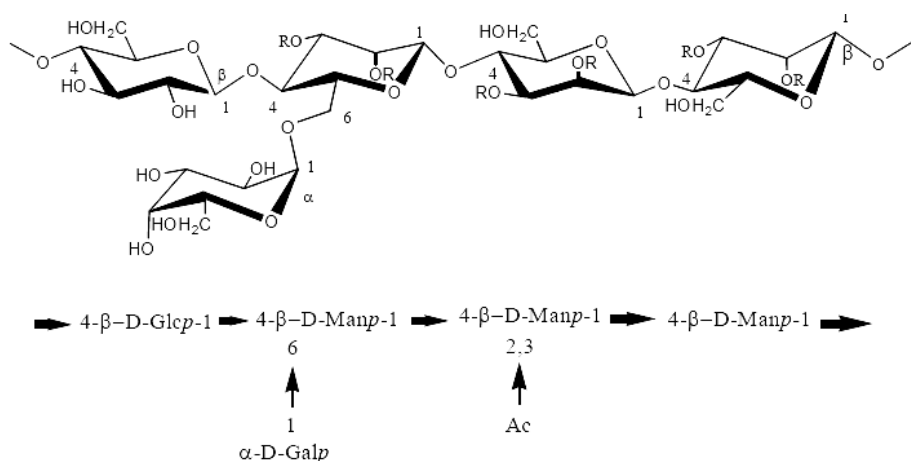
เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเฮเทอโรโพลิเมอร์เชิงพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ที่มี 5 คาร์บอน (ไซโลส และอะราบินอส) และ 6 คาร์บอน (แมนโนส, กลูโคส และกาแลคโตส) และน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิล (sugar acid) ประกอบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (Saha, 2003) ซึ่งเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลูคูโรโนไซแลน ในขณะที่ไม้เนื้ออ่อนจะประกอบด้วยกาแลคโตกลูโคแมนแนน (Klemm *et al.*, 1998) เฮมิเซลลูโลสจะละลายในสารละลายต่างแต่ไม่ละลายในน้ำ โดยเฮมิเซลลูโลสจะแตกต่างกับเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประเภทโฮโมโพลิเมอร์เชิงพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสประเภทเดี่ยวประกอบอยู่ในโมเลกุล เฮมิเซลลูโลสเป็นโมเลกุลที่มีค่ามวลโมเลกุลน้อยกว่ามวลโมเลกุลของเซลลูโลส และมีค่า Degree of polymerization (DP) ต่ำ (only 50-300) โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายด้วยสารละลายกรด แล้วให้โมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดเล็กลงคือ โมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบินอส (Klemm *et al.*, 1998) เฮมิเซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดต่างๆ ดังนี้คือ

- (1) กาแลคโตกลูโคแมนแนน (Galactoglucomannan) (Figure 2) ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส กลูโคส และกาแลคโตส
- (2) อะราบินอกลูคูโรโนไซแลน (Arabinoglucuronoxylan) (Figure 3) ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส อะราบินอส และกลูคูโรนิกแอซิด
- (3) กลูคูโรโนไซแลน (Glucuronoxylan) (Figure 4) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูคูโรนิกแอซิด และไซโลส
- (4) กลูโคแมนแนน (Glucomannan) (Figure 5) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และแมนโนส
- (5) อะราบินอกาแลคแทน (Arabinogalactan) (Figure 6) ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และอะราบินอส
- (6) อะราบินอกลูคูโรโนไซแลน (Arabinoxylan) (Figure 7) ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส อะราบินอส กลูคูโรนิกแอซิด และเฟอูลริกแอซิด

เฮมิเซลลูโลสสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น กลูคูโรโนไซแลน หรือไซแลน ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก จะนำมาใช้ในการผลิตไซโลส ไซลิตอล เฟอร์ฟูรอล อะราบินอกาแลคแทนใช้เป็น binder, emulsifier และ stabilizer ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนกลูโคแมนแนนสามารถหมักด้วยจุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นเอทานอลได้ (Saha, 2003) ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เก็บเกี่ยวจากวัสดุเศษเหลือจากทางเกษตร นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สารให้ความหวาน และอาหารสุขภาพ อุตสาหกรรมเภสัชกรรมสำหรับรักษาไวรัสและมะเร็ง (Cano and

Palet, 2007) นอกจากนี้ในเฮมิเซลลูโลสยังพบกรดเฟอร์ุลิก (ferulic acid) (Figure 8) ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีมีโครงสร้างคล้ายกับฟีนอล (phenol) จากการรายงาน พบว่า กรดเฟอร์ุลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ (Kawabata *et al.*, 2000; Kampa *et al.*, 2003)

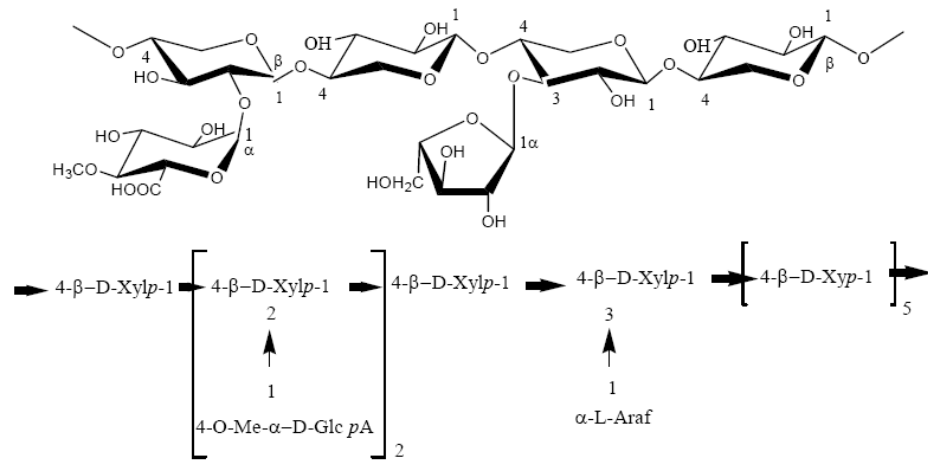
กระบวนการที่ใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูงจะสามารถแยกเอาเฮมิเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากกัน โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะละลายในน้ำที่ควบแน่นจากไอน้ำ ซึ่งจากการศึกษาของ วิทยา ปั้นสุวรรณ และคณะ (2551) โดยทำการทดลองต้มเยื่อเปลือกสาด้วยไอน้ำที่สภาวะอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที พบว่าได้เยื่อปอสาที่เหมาะสมในการทำกระดาษสา และได้สารละลายเฮมิเซลลูโลสเป็นผลพลอยได้ออกมาด้วย เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำตาลในสารละลายเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการระเบิดเปลือกปอสาด้วยไอน้ำ พบว่าองค์ประกอบหลักคือน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของ กาแลคโตส และอะราบิโนส และเมื่อไฮโดรไลซ์สารละลายด้วยเอนไซม์พบว่าน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของกลูโคสและไซโลส และการแยกสกัดอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวเจ้า โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลาครึ่งชั่วโมงกรองแยกส่วนที่ละลายน้ำนำมาตกตะกอนในสารละลายเอทานอล 70% (v/v) นำไปทำแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง ตกอนสารที่ได้ของการแยกสกัดอะราบิโนไซแลน ส่วนที่ละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ละลายน้ำจากรำข้าวมีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก 0.2 และ 7.6 ตามลำดับ (Luangwitthajaroen *et al.*, 2007)



Sugar units: β-D-glucopyranose (Glc); β-D-mannopyranose (Man); β-D-galactopyranose (Gal). R = CH<sub>3</sub>CO or H. The lower representation is the abbreviated formula showing the proportions of the units (galactose-rich fraction)

Figure 2. Principal structure of galactoglucomannans in softwood

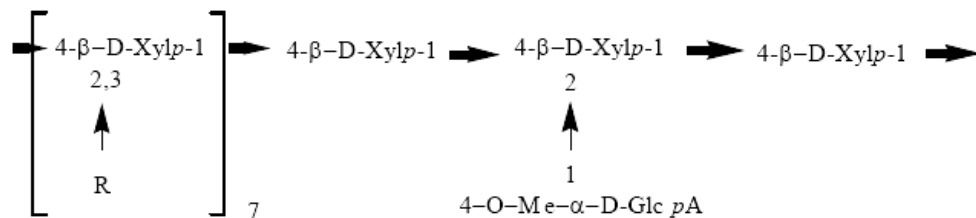
ที่มา : Klemm และคณะ (2005)



Sugar units:  $\beta$ -D-xylopyranose (Xylp); 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid (Glc pA);  $\alpha$ -L-Arabinofuranose (Araf). The lower representation is the abbreviated formula showing the proportions of the units.

Figure 3. Principal structure of arabinoglucuronoxylan in softwood

ที่มา : Klemm และคณะ (2005)



Sugar units:  $\beta$ -D-xylopyranose (Xylp); 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid (Glc pA);

R = Acetyl group ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

Figure 4. Principal structure of glucuronoxylan in hardwood

ที่มา : Klemm และคณะ (2005)

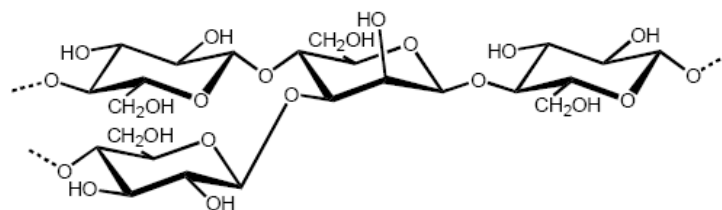


Figure 5. The structural representation of glucomannan from konjac



ที่มา : Li และคณะ (2006)

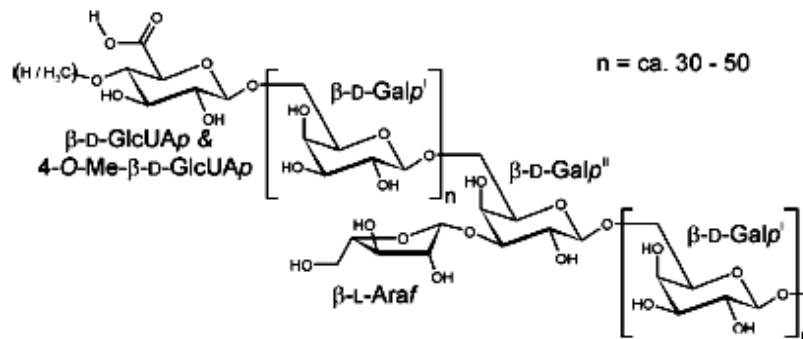


Figure 6. Structural details of AG-1. The galactose backbone is shown with the terminal glucuronic acids and the infrequently occurring single arabinose side chain

ที่มา : Brecker และคณะ (2005)

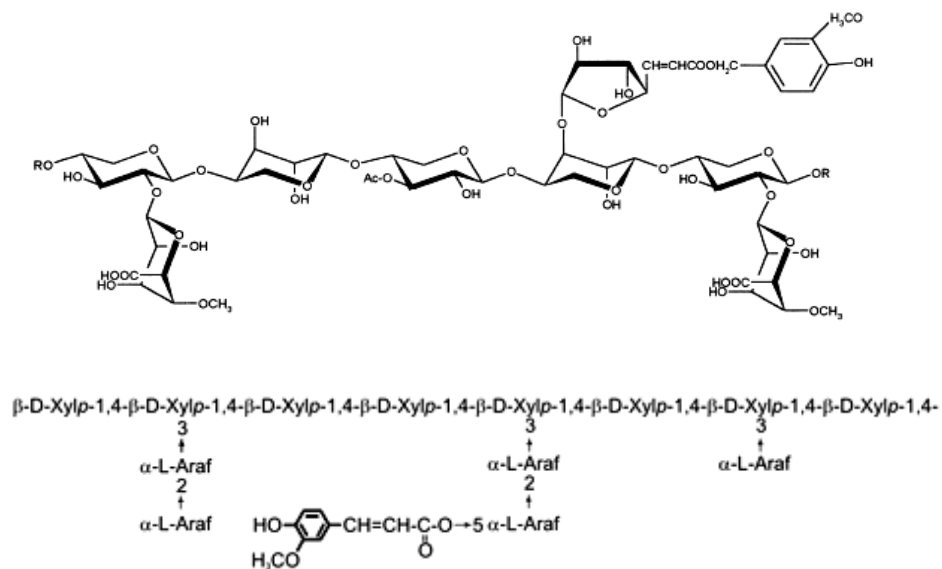


Figure 7. Arabinoxyylan from grasses

ที่มา : Vazquez และคณะ (2000)

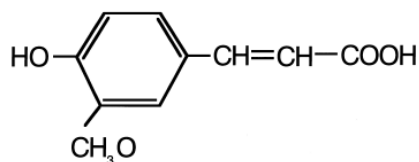


Figure 8. Molecular structure of ferulic acid

ที่มา : Kawabata และคณะ (2000)

### 3. ความหมายและคุณสมบัติของพรีไบโอติก

พรีไบโอติก (Prebiotics) คือ สารหรือองค์ประกอบในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน โดยสามารถทนต่อการย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และมีผลส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค มีประโยชน์คือช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและ/หรือการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่กลุ่มจำเพาะหรือจำนวนหนึ่งที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร โดยมีกลไกการทำงานดัง Figure 9 (Gibson and Roberfroid, 1995) พรีไบโอติกบางชนิดสามารถจับกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เชื้อ *Salmonella* และ *E. coli* ซึ่งต่อมาจะถูกกำจัดออกจากระบบทางเดินอาหารไปกับอุจจาระ บางชนิดอาจจะไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ เช่น เชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* โดยเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรีย ทำให้ลำไส้เกิดความสมดุลและยังช่วยเพิ่มการนำสารอาหารไปใช้ด้วย สารที่จะจัดเป็นพรีไบโอติกได้นั้นจะต้องมีลักษณะอย่างน้อย 3 ประการ คือ สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สารนั้นจะต้องมีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ และสารนั้นควรมีการกระตุ้นที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (Gibson, 2004)

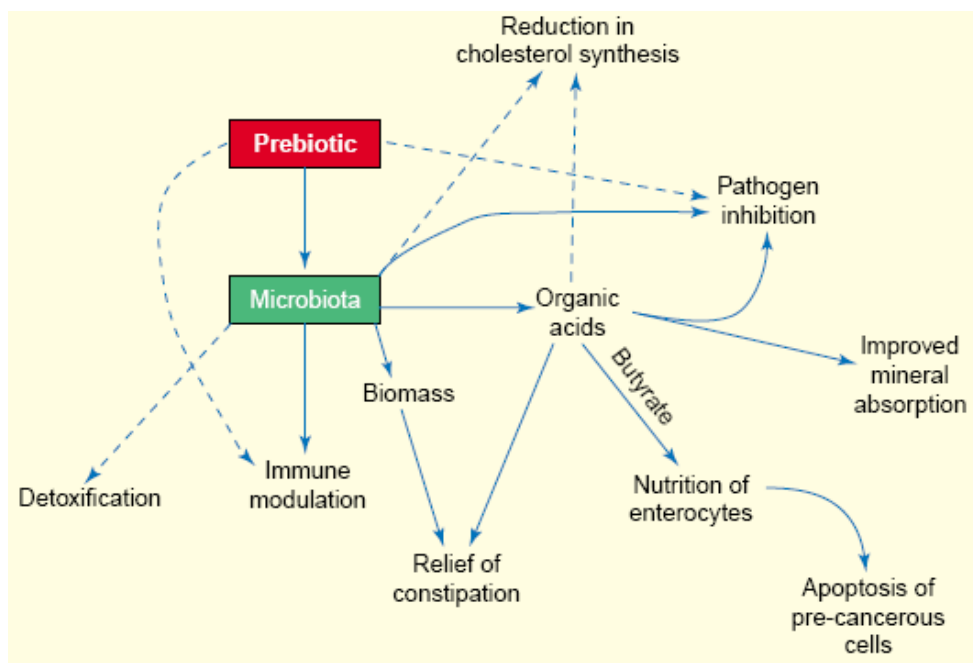


Figure 9. Schematic showing the possible mechanisms of prebiotic action. Solid lines indicate relatively well-established modes of action. Dotted lines indicate less well-established or speculative modes of prebiotic action

ที่มา : Ouwehand และคณะ (2005)

#### 4. ชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์

กลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ที่สามารถใช้เป็นสารพรีไบโอติก (Rycroft *et al.*, 2001) ได้แก่

##### 4.1 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลสเป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharides) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกาแลคโตสและฟรุกโตสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 glycosidic linkage (Gal  $\beta$ 1-4 Fru) ซึ่งผลิตโดยใช้ catalytic isomerization ของน้ำตาลแลคโตส ซึ่งแลคทูโลสจะไม่ถูกย่อยหรือดูดซับในลำไส้เล็กแต่จะเกิดการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ และมีผลให้จำนวน Lactobacilli และ Bifidobacteria เพิ่มขึ้น และช่วยลด *Bacteroides* นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เช่น ammonia, indole, phenol, skatole, nitroreductase, azoreductase และ  $\beta$ -glucuronidase จากการศึกษาผลของแลคทูโลสต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่โดยให้แลคทูโลส 3 กรัมต่อวัน ในอาสาสมัคร 8 คน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้น และแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Clostridium perfringens*, *Bacteroides*, Streptococci และ Enterobacteriaceae ลดลง (Terada *et al.*, 1992) โดยปกติแลคทูโลสจะไม่มีอยู่ในอาหารทั่วไปหรืออาจมีน้อยมากจึงมีการนำแลคทูโลสไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น โยเกิร์ต ลูกกี้ เล็ก และช็อคโกแลต เป็นต้น

##### 4.2 อินนูลิน (Inulin) และ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharides, FOS)

อินนูลินเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีฟรุกโตส 3-60 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ ,1-2 และ  $\beta$ ,2-1 โครงสร้างประกอบด้วย  $\text{Glc } \alpha$ 1-2[ $\beta$  Fru 1-2] $_n$  เมื่อ  $n = 10$  และ  $\text{Fru } \beta$ 2-1Fru $_n$  ซึ่งอินนูลินพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืชแบคทีเรีย และราบางชนิด อินนูลินไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก แต่บางส่วนถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ และมีความคงตัวสูง มีรสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้

ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่างๆ เช่น นำไปปรับปรุงในรสชาติและเนื้อสัมผัส ช่วยรักษาความสดและความชื้นในเค้ก

นอกจากนี้อินนูลินยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกเนื่องจากช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกในลำไส้ได้ โดยพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับอินนูลิน 15 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ Bifidobacteria และ Lactobacilli เพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคลดลง นอกจากนี้มีการศึกษาการเลี้ยงแบบกะโดยบ่ม faecal slurries ด้วยอินนูลิน โอลิโกฟรุกโตส แป้ง พอลิเด็คซ์โตรอส ฟรุกโตส และ เพคติน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าโอลิโกฟรุกโตสและอินนูลินช่วยเพิ่ม Bifidobacteria ได้อย่างดี (Wang and Gibson, 1993) และเป็นสารตั้งต้นพรีไบโอติกที่สำคัญ นอกจากนี้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่รู้จักกันในชื่อ “นีโอซูการ์ (Neosugar)” หรือ “ไมโอลิโก (Meiologo)” ซึ่งชนิดหลังเป็นสารผสมของ 1-kestose (Glc-Fru<sub>2</sub>), 1-nystose (Glc-Fru<sub>3</sub>) และ 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-nystose (Glc-Fru<sub>4</sub>)

#### 4.3 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galactooligosaccharides, GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบซึ่งมีโครงสร้างเป็น  $\text{Glu}\alpha\text{-1-4}\beta\text{ Gal 1-6}\text{ Glu}$  เมื่อ  $n = 2\text{-}5$  พบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์จากแลคโตสไซรัปโดยใช้เอนไซม์ transgalactosylase ของเอนไซม์ β-galactosidase

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharide) จึงสามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อยและดูดซึม และถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวเทอเรท และมีก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีผลไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli การศึกษาการเติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 20 กรัมต่อวัน ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องซึ่งมี human faecal bacteria พบว่าเกิดก๊าซและกรดไขมันสายสั้นเพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าไม่สามารถระบุชนิดแบคทีเรียได้ แต่การเพิ่ม lactate และ acetate ก็แสดงให้เห็นถึงการเด่น (dominate) ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (lactobacilli และ bifidobacteria) เมื่อมีการเติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์

#### 4.4 โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (Soybean oligosaccharides (SOR))

โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแรฟฟิโนส (raffinose) และสตาคีโอส (stachyose) (Gibson, 2004a) โดยสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองประกอบด้วย

stachyose 23% (w/v) และ raffinose 7% (w/v) และเมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วย activated charcoal chromatography จะประกอบด้วย stachyose 71%, raffinose 20% และน้ำตาลอื่นๆ อีก 2% โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองเป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถทนต่อการย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ ซึ่งจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่จะนำไปใช้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ซึ่งจากการศึกษาพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium infantis* แต่ไม่ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* หรือ *Lactobacillus acidophilus* จากการศึกษาของ Saito และคณะ (1992) ใช้ความเข้มข้นของ SOR ต่ำๆ (0.1% w/v) ในการเลี้ยง two-stage continuous ของ faecal bacteria พบว่าช่วยเพิ่มจำนวน bifidobacteria ขึ้นถึงสามเท่าในจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

#### 4.5 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครสผลิตมาจากการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นของน้ำตาลแลคโตสและซูโครส โดยใช้เอนไซม์เบต้าฟรุคโตฟูโรซิเดส ( $\beta$ -fructofuranosidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีคุณสมบัติไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria โดยพบว่าการให้แลคโตซูโครส ปริมาณ 3 กรัมต่อวัน กับอาสาสมัคร 3 คน สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ 0.7 เท่าและลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteriodes* ได้ 0.6 เท่า และยังส่งผลให้มีการผลิตกรดไขมันสายสั้น เช่น อะซิเตท และบิวเทอเรท เพิ่มขึ้นด้วย (Ohkusa *et al.*, 1995)

#### 4.6 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomaltooligosaccharides, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ ,1-6 glucosidic linkages ซึ่งเปลี่ยนมาจากแป้งโดยการใช้กระบวนการย่อยโดยใช้เอนไซม์ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้เอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ pullulanase ร่วมกันเพื่อย่อยแป้งให้เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ ,1-4 glycosidic linkage จากนั้นใช้เอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase เปลี่ยนเป็นพันธะ  $\alpha$ ,1-6 glycosidic linkage ซึ่งบางส่วนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็กได้เป็นไอโซมอลโตส (Kolida *et al.*, 2000) ในทางการค้าไอโซมอลโต-900 ผลิตจากการบ่มแป้งข้าวโพดที่มี isomaltose (Glc  $\alpha$ 1-6Glc), isomaltotriose (Glc  $\alpha$ 1-6Glc $\alpha$ 1-6Glc) และ panose (Glc  $\alpha$ 1-6Glc  $\alpha$ 1-4Glc) ด้วย amylase, pullulanase และ  $\alpha$ -glucosidase จากการศึกษาพบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่าเมื่อศึกษาการเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยใช้ระบบ Human colonic-batch culture ซึ่งมีการเติม IMO ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนของ bifidobacteria ได้ และปริมาณ clostridia ลดลง (Rycroft *et al.*, 2001)

#### 4.7 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Glucooligosaccharides, GOS)

กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ ,1-6 glucosidic linkages เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase ที่ผลิตจากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งจะย้ายโมเลกุลกลูโคสจากน้ำตาลซูโครสตัวให้ไปยังมอลโตสตัวรับ ผลของการให้ GOS แก่หนู สามารถเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium breve* และสามารถลดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ได้ (Asahara *et al.*, 2001)

#### 4.8 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylooligosaccharides, XOS)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ ,1-4 หลักๆจะประกอบด้วย xylobiose, xylotriose และ xylo-tetraose กลุ่มเหล่านี้สามารถผลิตได้จากการย่อย xylan จากเนื้อไม้เบิช โอ๊ต หรือซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยและถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์กลุ่ม bifidobacteria และ lactobacilli ได้อย่างจำเพาะทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteriodes* ลดลง อีกทั้งสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม bifidobacteria ได้มากกว่าการใช้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Gibson, 2004b) จากการศึกษาการหมัก XOS โดยแบคทีเรียในลำไส้ โดยให้อาสาสมัครผู้ชาย 5 คน รับประทาน XOS 1 กรัมและอีก 5 คน รับประทาน XOS 2 กรัมต่อวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ามีอาสาสมัครบางรายเท่านั้นที่ตอบสนองต่อ XOS โดยช่วยเพิ่ม bifidobacteria และช่วยลด *Bacteriodes* เมื่อหยุดการให้ XOS พบว่าสัดส่วนของ bifidobacteria ลดลงจากเริ่มต้น โดยปริมาณ XOS 1 กรัมต่อวันก็เพียงพอต่อการตอบสนองของ bifidobacteria

### 5. ประโยชน์ของพรีไบโอติก

ประโยชน์ของพรีไบโอติกนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกันกับประโยชน์ของโปรไบโอติกซึ่งเมื่อมีการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มนี้แล้วทั้งแบคทีเรียเองและสารที่เกิดจากกระบวนการในการใช้พรีไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนก็จะมีบทบาทต่อผู้บริโภคร โดยประโยชน์ของพรีไบโอติกที่มีต่อร่างกายได้แก่

#### 5.1 การป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่

มักพบปัญหาได้บ่อยในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งลำไส้ ซึ่งพบได้บ่อยมากในลำไส้ใหญ่เมื่อเทียบกับในลำไส้เล็ก (Morotomi *et al.*, 1990) ด้วยสาเหตุนี้ นักวิจัยหลายท่านจึงเชื่อว่า colonic microflora มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของมะเร็งลำไส้ เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่โดยทั่วไปในลำไส้สร้างสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

และสารกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกจากกระบวนการเผาผลาญอาหารของส่วนประกอบอาหาร แต่มีการพิสูจน์แล้วว่า 프리ไบโอติกสามารถป้องกันมะเร็งได้ แนวทางในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่จึงจะมุ่งไปที่ 프리ไบโอติกซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียโดยบทบาทของ 프리ไบโอติกในการป้องกันมะเร็งมีดังนี้

5.1.1 เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะบิวทิเรตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักและมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ใน colonic cancer cell lines และถูกใช้ในการเจริญของเซลล์อีกด้วย โดยบทบาทของบิวทิเรตและกรดไขมันสายสั้นชนิดอื่น ๆ คือ โพรพิโอนิก และอะซิติก จะส่งผลโดยตรงต่อเซลล์ลำไส้ใหญ่ในการป้องกันมะเร็ง

5.1.2 เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ให้เป็นไปในทางที่จะลดการเกิดสารที่จะส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น เมแทบอลิซึมของโปรตีนและไขมัน โดยอาจจะเปลี่ยนเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย Clostridia และ Bacteroides จากการเกิด proteolysis ไปเป็น saccharolysis และมีบทบาทในการส่งเสริมให้แบคทีเรียแลคติกสร้างสารที่ไปยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ carcinogenic นอกจากนี้ 프리ไบโอติกยังมีผลไปเปลี่ยนแปลงโดยตรงต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น azoreductases, nitroreductases และ  $\beta$ -glucuronidase เป็นต้น (Reddy, 1998)

## 5.2 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ฟรีไบโอติกช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ bifidobacteria และ lactobacilli โดยช่วยลดจำนวนกลุ่มเชื้อที่ก่อโรค เชื้อไวรัส โปรโตซัว รา และแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกี่ยวกับการเผาผลาญอาหาร เช่น กรดที่หลังโดยกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ จะทำให้ค่าพีเอชภายในลำไส้ต่ำลงถึงระดับที่มีผลไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ยิ่งไปกว่านั้น lactobacilli และ bifidobacteria หลายสปีชีส์ที่สร้าง antibiotics ซึ่งสามารถไปยับยั้งเชื้อก่อโรคในลำไส้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Gibson, 2004a; Gibson, 2004b)

## 5.3 เพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ

ฟรีไบโอติกสามารถเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ โดยเฉพาะการดูดซึมของแคลเซียมและแมกนีเซียมซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคกระดูกพรุน ถึงแม้ว่าลำไส้เล็กเป็นตำแหน่งแรกของการดูดซึมแคลเซียมแต่ยังคงมีการดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่อยู่และยังคงได้รับความสนใจอยู่เสมอ ซึ่งกลไกในการเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ (Gibson, 2004a; Gibson, 2004b) มีดังนี้

5.3.1 กระบวนการหมักของพรีไบโอติกจะทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) ซึ่งทำให้พีเอชในลำไส้ใหญ่ลดลงจึงทำให้แคลเซียมละลายได้ดีส่งผลให้มีการดูดซึมที่ดีขึ้นด้วย

5.3.2 สารที่อยู่ในกลุ่ม Phytate (myoinositol hexaphosphate) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืช โดยเป็นสารที่มีความเสถียรสูงและไม่ละลายน้ำทำให้เมื่อไปจับกับแคลเซียมทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมแคลเซียมได้และจากกระบวนการหมัก Phytate โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ทำให้แคลเซียมถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระและมีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้

5.3.3 เกิดกลไกในการแลกเปลี่ยนแคลเซียมภายในลำไส้โดยที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนโปรตอนระหว่างแคลเซียมกับ SCFA ที่มีอยู่ในลำไส้

#### 5.4 ลดระดับคอเลสเตอรอลและไขมันในเลือด

ปัจจุบันมีความสนใจในอุตสาหกรรมอาหารในการพัฒนาอาหารสุขภาพเพื่อลดไขมันในเลือดเช่น คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ โดยถ้าระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้น โดยเฉพาะ low-density lipoproteins (LDL) จะเสี่ยงต่อการเป็นโรคภาวะหัวใจล้มเหลว สำหรับการศึกษาลดระดับคอเลสเตอรอล ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามมีการอธิบายกลไกการลดระดับแอลดีแอลคอเลสเตอรอลโดยไปเพิ่มจำนวนแบคทีเรียแลคติก ให้มากขึ้นก็จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอลและยับยั้งการดูดซึมผ่านผนังลำไส้ หรืออาจเนื่องจากผลจากกระบวนการหมักที่ได้กรดไขมันสายสั้นบางชนิด โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิก ซึ่งสามารถไปยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันรวมทั้งคอเลสเตอรอล อีกกลไกหนึ่งคือมีการปรับเปลี่ยนระดับกลูโคสและอินซูลิน เนื่องจากการสังเคราะห์ไขมันมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของกลูโคสด้วย ดังนั้นพรีไบโอติกอาจช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดแข็งซึ่งมีสาเหตุจากไขมัน โดยเฉพาะภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (hypertriglyceridemia) และภาวะดื้ออินซูลิน (insulin resistance) (Gibson, 2004a; Gibson, 2004b)

#### 5.5 ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน

พรีไบโอติกไปช่วยส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกเช่น กลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยโปรไบโอติกจะไปช่วยกระตุ้นกลไกการปกป้องเจ้าบ้านแบบไม่จำเพาะและตอบสนองแบบจำเพาะของเซลล์ โดยช่วยเพิ่ม phagocytic activity และ/หรือการเพิ่มโมเลกุลของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การหลั่ง IgA ซึ่งมีผลไปยับยั้งเชื้อก่อโรคเช่น salmonellae และ rotavirus (Schiffrin *et al.*, 1995)



## 6. เชื้อรา *Cordyceps* sp.

*Cordyceps* เป็นฟังไจชั้นสูงจัดอยู่ในกลุ่มของแอสโคฟังไจ (sac fungi) หรือราแมลง โดยอาจเรียกว่า entomopathogenic, entomogenous หรือ insect fungi ในระยะที่มีการสืบพันธุ์จะสร้าง ascocarp แบบ perithecium เป็นกลุ่มรวมกันอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า stroma ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีการดำรงชีวิตแบบพาราสิต พบมากบริเวณป่าเขตร้อนที่มีความชื้น หรือในช่วงฤดูฝน ส่วนใหญ่เป็นพาราสิตบนตัวอ่อน คดด้ว และตัวเต็มวัยของแมลง เช่น ผีเสื้อ มด มวน ค้างคาว และผีเสื้อ เป็นต้น *Cordyceps* จะเข้าทำลายแมลงที่เป็น host โดย ascospores ที่ไปตกหรือสัมผัสบนตัวแมลงแล้วจะสร้าง germ tube แทะผ่านผิวชั้นนอกของแมลงโดยการย่อยสลายไคติน (chitin) เส้นใยจะเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายใน hemocoel ของแมลง หลังจากแมลงตายเส้นใยจะรวมตัวกันกลายเป็น sclerotium อัดแน่นอยู่ในตัวแมลง เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม sclerotium จะพัฒนาไปเป็น stroma เจริญออกมาบนผิวหนังของแมลงที่เป็น host เมื่อ stroma เจริญเติบโตเต็มที่ และ ascospores ถูกปล่อยออกไปแล้วจากนั้นก็สลายไป ซึ่งซากของแมลงที่เหลืออยู่ก็จะมีโครงสร้าง stroma ขึ้นมาใหม่ได้อีก (Cheah *et al.*, 2004) ดังแสดงตาม Figure 10.

*Cordyceps* หลายสปีชีส์นิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์ในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีและประเทศแถบตะวันออก เพราะว่ามีสรรพคุณด้านยาและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Shih *et al.*, 2007) เนื่องจากมีการสร้างสารเมตาโบไลต์ที่มีประโยชน์หลายชนิด (Table 5) เช่น adenosine มีคุณสมบัติช่วยป้องกันโรคหัวใจและเป็นยารักษาโรคหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (Kitakaze *et al.*, 2000), cordycepin หรือ 3'-deoxyadenosine เป็นสารคล้ายกับนิวคลีโอไซด์ที่แสดงสเปกตรัมทางชีวภาพในช่วงกว้าง รวมทั้งเป็นสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา ด้านการเกิดเนื้องอก (antitumor) ด้านการเกิดลูคีเมีย (antileukemia) มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (antiviral activities) และมีผลต่อการควบคุมภูมิคุ้มกัน (Sugar *et al.*, 1998; Kodama *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002), ในกลุ่ม polysaccharides จากเชื้อ *Cordyceps* ใช้ประโยชน์ทางชีวภาพในการช่วยลดการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้านการเกิดเนื้องอก antimetastatic immunomodulatory ช่วยรักษาอาการ hypoglycaemic steroidogenic และ hypolipidaemic (Yang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005), นอกจากนี้ยังมีสาร immunopotentiating galactomannan และ L-tryptophan (Bok *et al.*, 1999) สาร rythrostominone, deoxyerythrostominon, 4-O-methyl erythrostominon, epierythrostominol, dexycrythrostrominal

และ 3, 5, 8-trihydroxy-6-methoxy-295-oxohepta-1, 3-dien-1, 4-naphthoquinone ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพในกลุ่ม naphthoquinones สร้างโดย *Cordyceps unilateralis* BCC1896 ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth สารประกอบทั้ง 6 ชนิดนี้มีผลในการต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคมalaria เรียกว่า *Plasmodium falciparum* (Kittakoop *et al.*, 1999) นอกจากนี้ *Cordyceps* บางสปีชีส์ยังมีความสามารถในการสร้างสารประกอบชนิดใหม่อีกด้วย เช่น *Cordyceps pseudomilitalis* สร้างสาร cordyanhyides A และ B (Figure 11) สารประกอบทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นสารที่พบได้ยากในธรรมชาติ (Isaka *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Koh และคณะ (2002) พบว่า mycelia จาก *Cordyceps* ก็ยังสามารถใช้เป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้

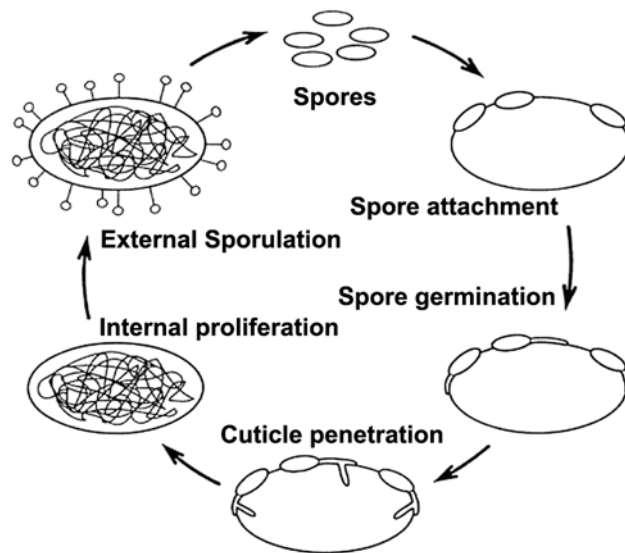


Figure 10. The life cycle of *Cordyceps* sp.

ที่มา : Cheah และคณะ (2004)

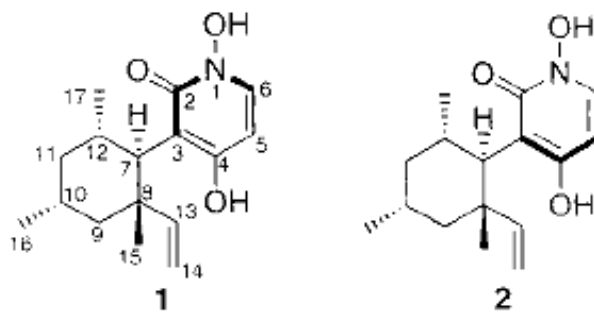


Figure 11. Structures of compounds from *Cordyceps nipponica* (1) cordypyridones A (*N*-Hydroxy-2-pyridones), (2) B (*N*-Methoxy-2-pyridones)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Isaka และ Tanticharoen (2001)

Table 5. Compounds isolated from *Cordyceps* species and biological activity

Scientific name	Compound	Activity	References
<i>C. militaris</i>	Adenine	-	Huang <i>et al.</i> , 2003
	Adenosine		
	Cordycepin		
	Hypoxanthine		
<i>C. nipponica</i> BCC 1389	Cordypyridone A	Antimalarial	Isaka <i>et al.</i> , 2001
	Cordypyridone B	activity	
	Cordypyridone C		
	Cordypyridone D		
<i>C. pseudomilitaris</i> BCC 1620	Bioxanthracene 1	Antimalarial	Jaturapat <i>et al.</i> , 2001
	Bioxanthracene 2	activity	
	Bioxanthracene 3		
	Bioxanthracene 4		
	Bioxanthracene 5		
	Bioxanthracene 6		
	Bioxanthracene 7		
	Bioxanthracene 8		
	Bioxanthracene 9		
	Bioxanthracene 10		
	Bioxanthracene 11		
	Oxanthracene 12		
	Oxanthracene 13		
	Cordyanhydride A		
Cordyanhydride B			

Table 5. (Continued)

Scientific name	Compound	Activity	References
<i>C. unilateralis</i>	Erythrostrominone	Antimalarial	Kittakoop <i>et al.</i> , 1999
	Deoxyerythrostrominone	activity	
	4-O-methylerythrostrominone	Cytotoxicity	
	Epierythrostrominol		
	Deoxyerythrostrominol		
	3,5,8-trihydroxy-6-methoxy-2-(5-oxo-hexa-1,3-dienyl)-1,4-naphthoquinone		
<i>C. sinensis</i>	5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -epidioxy-24-(R)-methylcholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -D-glucopyranoside	Antitumor	Bok <i>et al.</i> , 1999
	5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-24-(R)-methylcholesta-7,22-dien-3 $\beta$ -olergostery-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside		
	22,23-dihydroer-gosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside		
	Adenine		
	Adenoside		
	Cordycepin		
	Hypoxanthine		
<i>Cordyceps</i> sp. BCC 1681	Cordytropolone	Antimalarial activity	Isaka <i>et al.</i> , 2001

ที่มา : ดัดแปลงจาก Pramjit (2004)

## 7. พอลิเมอร์ชีวภาพ

พอลิเมอร์ชีวภาพ คือ พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย, แอคติโนมัยซีส และรา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยพอลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นจะมีลักษณะเป็นสารที่มีความหนืดและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ระพีพรรณ เต็มตันท์, 2547) โดยพอลิเมอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตจะมีคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ รวมถึงองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งพอลิเมอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตสามารถทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี พอลิเมอร์ชีวภาพสามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือทิ้ง ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ชีวภาพกันอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้ในด้านเภสัชกรรม ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหรือใช้เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ (ชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2527)

โดยพอลิเมอร์เหล่านี้มีคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพรวมถึงองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน พอลิเมอร์ชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ตามองค์ประกอบของพอลิเมอร์ ได้แก่ พอลิเมอร์ชนิดลิปิด พอลิเมอร์ชนิดโปรตีน พอลิเมอร์ชนิดพอลิอะมิโนแอซิด พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์

พอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อราสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

### 7.1 พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides)

เป็นพอลิเมอร์ที่มีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งเกิดจากการที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กรดซูโรนิก หรือ น้ำตาล กรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก และบางครั้งยังพบสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์รวมอยู่ในโครงสร้างด้วย พอลิเมอร์กลุ่มพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อรามีหลายแบบขึ้นกับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก คือ

#### 7.1.1 จำแนกตามกระบวนการสังเคราะห์

ตัวอย่างพอลิเมอร์ได้แก่ พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ (intracellular polymer) และ จุลินทรีย์หลั่งพอลิเมอร์ออกมาภายนอกเซลล์ใน 2 รูปแบบ คือแคปซูลซึ่งยึดติดอยู่กับผนังเซลล์ และในรูปของเมือกซึ่งปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์ โดยโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตมีชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบและตำแหน่งของพันธะแตกต่างกัน นอกจากนี้ก็มีพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์

ภายในเซลล์ (intracellular polymer) ต้องอาศัยการสกัด และการทำบริสุทธิ์เพื่อนำเอาพอลิเมอร์ ออกจากเซลล์ พอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ได้แก่ พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) ซึ่งได้จาก *Alcaligenes* sp.

### 7.1.2 จำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิเมอร์

โดยทั่วไปนิยมใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์ Moo-Yang (1985 อ้างโดย ศิริพร หมาดหล้า, 2544) จำแนกพอลิแซคคาไรด์ได้แก่

7.1.2.1 พอลิเมอร์ที่มีประจุลบ (anionic polysaccharide) ตัวอย่างพอลิเมอร์ในกลุ่ม นี้ได้แก่ แซนแทน (xanthan) จากเชื้อ *Xanthomonas campestris* (Triveni and Shamala, 1998)

7.1.2.2 พอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ตัวอย่างพอลิเมอร์ใน กลุ่มนี้ได้แก่ พูลลูแลน (pullulan) จากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* (West and Strohfus, 2001) *Cryphonectria parasitica* (Forabosco et al., 2006) และ สเคอโรกลูแคน (scleroglucan) จากเชื้อ *Sclerotium rolfii* (Vinarta et al., 2006)

7.1.2.3 พอลิเมอร์ที่มีประจุบวก (cationic หรือ basic polysaccharide ) ตัวอย่าง พอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไคโตแซน ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของราอันดับ Mucorales

### 7.1.3 จำแนกตามโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ

Sutherland (1990) ได้จำแนกชนิดของพอลิแซคคาไรด์ตามองค์ประกอบภายใน โมเลกุลออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

#### 7.1.3.1 โฮโมพอลิแซคคาไรด์

เป็นพอลิเมอร์ชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวในโครงสร้าง เช่น กลูแคน โดยส่วนมากจะเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโตส จากการที่น้ำตาลกลูโคสเป็นสาร องค์ประกอบหลักและมีการเชื่อมต่อด้วยพันธะที่แตกต่างกันทำให้สามารถแบ่งกลูแคนออกเป็นได้ หลายชนิด เช่น bacterial cellulose ( $\beta$ -D-glucan), pullulan ( $\alpha$ -D-Glucan), curdlan (1,3- $\beta$ -D-glucan from bacteria), scleroglucan (1,3- $\beta$ -D-glucan from fungi) (Table 6)

#### 7.1.3.2 เฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์

พอลิเมอร์กลุ่มพอลิแซคคาไรด์ส่วนมากจัดอยู่ในกลุ่มนี้ โดยโครงสร้างจะ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปเชื่อมต่อกัน แต่ในบางชนิดอาจมีน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวที่ต่างกันถึง 5 ชนิด และยังมีองค์ประกอบอื่นๆ เช่น sn-glycerol-3-phosphate, N-acetyl-aminosugar, ฟอสเฟต หรือ หมู่อะซิทิล รวมอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลพอลิเมอร์ด้วย ซึ่งจากองค์ประกอบที่ต่างกันนี้ทำให้คุณสมบัติของพอลิแซคคาไรด์แตกต่างกัน เนื่องจากพันธะ และโครงสร้างของโมเลกุลต่างกัน (Table 7)

### 7.1.3.3 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์

สารอินทรีย์ที่พบในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ อะซิเตท ไพรูเวท ซักซิเนต โพรพิโอเนต ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จะมีผลต่อประจุรวมบนโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้สารดังกล่าวแล้วยังพบกรดอะมิโน ได้แก่ ซีรีน และกรดกลูตามิก ในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดอีกด้วย

### 7.1.3.4 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์

ฟอสเฟตเป็นสารอนินทรีย์ที่พบได้บ่อยในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งจะเหมือนกับกรด teichoic acid โดยจะอยู่ในรูปของ phosphorylated exopolysaccharide พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้จะพบฟอสเฟตในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดมีซัลเฟตอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลด้วย

Table 6. Chemical structures of homopolysaccharide

Linkages and types	Sources	Main chain	Branch
(1 → 3)-β-d-glucan	Scleroglucan from <i>Sclerotium sclerotia</i>	(1 → 3)-β-d-glucan	(1 → 6)-β-
	An alkali-soluble glucan from <i>Pleurotus tuber-regium</i>	(1 → 3)-β-d-glucan	(1 → 6)-β-
Linear (1 → 3)-β-d-glucan	<i>Auricularia auricula</i>	(1 → 3)-β-d-glucan	-
Linear (1 → 6)-α-glucan	<i>Armillariella tabescens</i>	(1 → 6)-α-d-glucan	-
(1 → 3)-β-d-glucan with 1-2 or 1-6 branches	<i>Pachyman from Poria cocos</i>	(1 → 3)-β-d-glucan	(1 → 2)-β-or (1 → 6)-β-
(1 → 3)-α-glucan	<i>Armillariella tabescens</i>	(1 → 3)-α-glucan	-
(1 → 4)-α-; (1 → 6)-β-glucan	<i>Agricus blazei</i>	(1 → 6)-β-d-glucan	(1 → 4)-α-

ที่มา : Zhang และคณะ (2006)

Table 7. Chemical structures of heteropolysaccharides

Polysaccharide	Linkages and types	Sources	Main chain	Branch
Heteroglucans	(1→3)-β-	<i>Ganoderma</i>	(1→3)-β-	Glucuronic
	glucuronoglucan	<i>lucidum</i>	glucuronoglucan	acid
	Xyloglucan	<i>Grifola</i> <i>frondosa</i>	Glucan	Xylose
	Arabinoglucan	<i>Ganoderma</i> <i>tsugae</i>	Glucan	Arabinose
	Riboglucan	<i>Agricus blazei</i>	Glucan	Ribose
	Galactomannoglucan	<i>Hohenbuehelia</i> <i>serotina</i>	Glucan	Galactose and mannose
	Galactoxyloglucan	<i>Hericium</i> <i>erinaceus</i>	Glucan	Galactose and xylose
	Mannoxyloglucan	<i>Grifolan</i> <i>frondosa</i>	Glucan	Mannose and xylose
Heterogalactan	Xylogalactoglucan	<i>Inonotus</i> <i>obliquus</i>	Glucan	Xylose, galactose
	Glucogalactan	<i>Ganoderma</i> <i>teugae</i>	Galactan	Glucose
	Arabinogalactan	<i>Pleurotus</i> <i>citrinopileatus</i>	Galactan	Arabinose
	Fucogalactan	<i>Sarcodon</i> <i>aspratus</i>	Galactan	Fucose
	Mannogalactan	<i>Pleurotus</i> <i>pulmonarius</i>	Galactan	Mannose



Table 7. (Continued)

Polysaccharide	Linkages and types	Sources	Main chain	Branch	
Other heteroglycans	Fucomannogalactan	<i>Grifola</i>	Galactose	Fucose	
		<i>frondosa</i>		mannose	
	Glucoxylan		Xylan	Glucose	
	Mannogalactofucan	<i>Grifola</i>	Fucan		Mannose and
		<i>frondosa</i>			galactose
	Mannoglucoxylan	<i>Hericium erinaceus</i>		Xylose	Mannose,
					glucose
	(1→3)- $\alpha$ -mannan	<i>Dictyophora indusiata</i>	(1→3)- $\alpha$ -mannan		-
Glucomannan			Mannan	Glucose	
(1→2)- $\beta$ -; (1→3)- $\beta$ -glucomannan	<i>Agricus blazei</i>		(1→3)- $\beta$ -linked mannose	(1→2)- $\beta$ -glucan	

ที่มา : Zhang และคณะ (2006)

## 7.2 พอลิแซ็กคาโรเปปไทด์ (Polysaccharopeptides)

พอลิเมอร์ชนิดนี้มีน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น พอลิแซ็กคาโรเปปไทด์แยกได้จากเชื้อ *Cordyceps sphecocephala* มี 3 fraction คือ FR-I, FR-II และ FR-III ซึ่งมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในแต่ละ fraction มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและน้ำหนักโมเลกุลของ FR-I, FR-II และ FR-III วัดได้ 1831, 27 และ 2.2 kDa ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทั้งสาม fraction พบว่าในส่วนของโปรตีนประกอบด้วย กรดและกรดอะมิโนแบบไม่มีขั้ว เช่น aspartic acid, glutamic acid, glycine และ valine และในส่วนของน้ำตาลมี mannose และ galactose เป็นส่วนใหญ่ (Oh *et al.*, 2007) พอลิแซ็กคาโรเปปไทด์ หรือ protein-bound polysaccharides หลายชนิดเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากราในกลุ่ม white rot fungus เช่น *Coriolus versicolor* โดย polysaccharopeptides ที่ผลิตโดย *Coriolus versicolor* มีฤทธิ์เป็น

ตัวกระตุ้นระบบ immunopotentiator ซึ่งใช้เป็นตัวเสริมการบำบัดทางเคมีและรังสีของมะเร็งและการติดเชื้อต่างๆ Wang และคณะ (1995) พบว่า polysaccharide-peptide complex (PSPC) จากการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อ *Tricholoma* sp. ในอาหารเหลวมีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและต้านมะเร็ง ซึ่งเชื่อนี้จัดอยู่ในกลุ่มเห็ดที่สามารถรับประทานได้ โดย PSPC ใน gel filtration มีน้ำหนักโมเลกุล 17 K และเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis แสดงเป็นแถบเดี่ยว พอลิเมอร์นี้มีลักษณะไม่ดูดซับบน DEAE-sepharose CL-6B และ CM-cellulose ซึ่งสามารถมีฤทธิ์กระตุ้น macrophage กระตุ้นการขยายของ T-cell และยับยั้งการโตของเนื้องอกในหนู

พอลิแซคคาไรด์และพอลิแซคคาโรเปปไทด์ได้มีการแยกจากเห็ดและเป็นที่น่าสนใจในด้านกิจกรรมทางชีวภาพที่หลากหลาย มีรายงานว่า polysaccharide complex จากเห็ดมีบทบาทในการต้านมะเร็ง เช่น พอลิแซคคาโรเปปไทด์ที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อ *Coriolus versicolor* และที่แยกจากเชื้อ *Tricholoma lobayense* (Oh et al., 2007) พอลิแซคคาไรด์และพอลิแซคคาโรเปปไทด์ที่แยกได้จากกลุ่มราชั้นสูงสามารถเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและช่วยต้านมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงพอลิแซคคาไรด์และพอลิแซคคาโรเปปไทด์จากเชื้อรา เช่น PSK lentinan และ schizophyllan มีผลเป็นตัวยับยั้งการโตของเนื้องอก sarcoma 180 ซึ่งถูกปลูกไว้ในหนู (Wang et al., 1995)

จากคุณสมบัติทางด้านชีวภาพและกายภาพสามารถนำ EPSs ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มาประยุกต์ในด้านต่างๆ เช่นทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร การใช้ในการทำเครื่องสำอาง และการประยุกต์ใช้เกี่ยวกับการแพทย์ (Table 8)

## 8. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรา *Cordyceps* sp.

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต เช่น ลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสภาวะสิ่งแวดล้อม โดยปัจจัยทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีผลต่อการผลิตสารพอลิเมอร์ชีวภาพของจุลินทรีย์ว่าจะมีการผลิตในช่วงใดของการเจริญ เช่น มีการผลิตไปพร้อมกับการเจริญหรือผลิตหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญไปได้ในระยะหนึ่ง ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารพอลิเมอร์ชีวภาพของจุลินทรีย์มีหลายปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีววิทยา เช่น ความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจน (อัตราส่วน C:N) พีเอช อุณหภูมิ อัตราการกวนที่เหมาะสมในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อการผลิตสารพอลิเมอร์ชีวภาพ และการเจริญของจุลินทรีย์

Table 8. Established applications of microbial exopolysaccharides

Property	Use	Polymer
Biological : properties	Antitumor agents	$\beta$ -D-Glucans
	Eye and joint surgery	Hyaluronic acid ( <i>Streptococcus</i> EPS)
	Heparin analogues	<i>Escherichia coli</i> K5 EPS
	Wound dressings	Bacterial cellulose
Chemical properties :	Enzyme substrates	<i>Escherichia coli</i> K4 and K5 EPS
	Oligosaccharide preparation	Curdlan, pullulan, scleroglucan
Physical properties :		
Emulsion stabilization	Foods, thixotropic paints	Xanthan
Fiber strength	Acoustic membranes	Bacterial cellulose
Film formation	Food coatings	Pullulan
Flocculants	Water clarification ore extraction	Various
Foam stabilization	Beer, fire-fighting fluids	Xanthan
Gelling agents	Cell and enzyme technology	Gellan
	Foods	Curdlan, gellan
	Oil recovery	Curdlan, xanthan
Hydrating agents	Cosmetics, pharmaceuticals	Hyaluronic acid
Inhibitor of crystal formation	Frozen foods, pastilles and sugar syrups	Xanthan
		Xanthan
Shear thinning and viscosity control	Oil-drilling 'muds'	
		Xanthan
Suspending agent	Foods	Various
	Paper coatings	Xanthan
	Agrochemical pesticides and sprays	Xanthan
Viscosity control	Jel printing	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sutherland (1998)

### 8.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดย Oh และคณะ (2007) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ (exobiopolymer) ของเชื้อ *Cordyceps sphecocephala* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดยได้ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพและมวลชีวภาพของเส้นใยสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 40 กรัมต่อลิตร และพบว่า การเจริญจะถูกยับยั้งเมื่ออาหารมีปริมาณของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร เป็นเพราะว่ามีแรงดันออสโมติกสูง

Kim และคณะ (2003) ได้รายงานผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ *Cordyceps militaris* C738 พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ให้ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพและมวลชีวภาพของเส้นใยสูงสุดเมื่อใช้ เซลโลไบโอส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และได้พอลิเมอร์ชีวภาพสูงสุดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร

### 8.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

Oh และคณะ (2007) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Cordyceps sphecocephala* โดยใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและอินทรีย์ไนโตรเจนอย่างละ 7 ชนิด พบว่าได้ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพและมวลชีวภาพของเส้นใยสูงสุดเมื่อใช้ polypeptone หรือ yeast extracts และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Kim และคณะ (2003) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Cordyceps militaris* C738 พบว่าการเจริญของเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย ผงน้ำแช่ข้าวโพด มีทเปปโตน พอลิเปปโตน หรือ ยีสต์สกัด ให้พอลิเมอร์ชีวภาพในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญ แหล่ง อินทรีย์ไนโตรเจนทั้งหมดให้การเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้น้อย ในขณะที่การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพให้ผลที่ดีในพอลิเปปโตนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

### 8.3 แหล่งแร่ธาตุ

Oh และคณะ (2007) พบว่าแหล่งแร่ธาตุต่างๆมีผลต่อการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งในด้านการกระตุ้นและการยับยั้งการผลิต สำหรับแหล่งแร่ธาตุในอาหาร mushroom complete medium  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.46 กรัมต่อลิตร,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 กรัมต่อลิตร และ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัมต่อลิตร ให้ผลการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Cordyceps sphecocephala* ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งแร่ธาตุตัวอื่นๆ

Kim และคณะ (2003) พบว่าแหล่งแร่ธาตุที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพของ *Cordyceps militaris* C738 โดยเชื่อว่าการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสูงสุดในอาหารที่มี  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ซึ่งปริมาณโพแทสเซียมไอออน ( $\text{K}^+$ ) เป็นธาตุที่จำเป็นต่อประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ

### 8.4 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิจัดเป็นปัจจัยทางกายภาพอย่างหนึ่งที่สำคัญซึ่งมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่แตกต่างกัน จากการศึกษานี้ของ Kim และคณะ (2003) พบว่า *Cordyceps militaris* C738 มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพอยู่ในช่วง 20 และ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อ *Cordyceps sphecocephala* และ *Grifola frondosa* มีการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้ดีที่ 25 องศาเซลเซียส (Lee et al., 2004; Oh et al., 2007)

### 8.5 ผลของพีเอช

ระดับพีเอชของสภาวะการเลี้ยงมีผลต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์และการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ในกรณีของ *G. frondosa* เจริญได้ดีและผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุดที่พีเอช 5.5 (Lee et al., 2004) ส่วนพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *C. sphecocephala* คือ 5.5 ในขณะที่เชื่อจะสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุดที่พีเอช 4.0 (Oh et al., 2007) และจากการศึกษาของ Kim และคณะ (2003) พบว่า *C. militaris* C738 เมื่อเลี้ยงที่พีเอช 6.0 เชื่อให้ความเข้มข้นพอลิเมอร์สูงสุดคือ 0.29 g/l ในทางกลับกันจะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 8.1 g/l เมื่อเลี้ยงที่พีเอช 9.0 จะเห็นว่าบางครั้งระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญก็อาจไม่ใช่ช่วงที่มีการผลิตดีที่สุดก็ได้ นอกจากนี้เมื่อมีการควบคุมพีเอช (6.0) การผลิตพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ควบคุมพีเอช

## 9. สารตกตะกอนชีวภาพ (Bioflocculant)

สารตกตะกอนที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

ก. กลุ่มสารอินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต พอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ (PAC)

ข. กลุ่มสารอินทรีย์ เช่น อนุพันธ์พอลิอะคริลาไมด์ (PAA), พอลิอะคริลิกแอซิด และพอลิเอทิลีนเอไมด์

ค. สารตกตะกอนชีวภาพ เช่น ไคโตแซน โซเดียมอัลจินेट เจลาติน เพคติน และ สารตกตะกอนจากจุลินทรีย์

สารตกตะกอนชีวภาพ (Biofloculant) สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย และ *Actinomyces* ซึ่งสามารถแยกได้จากดินและแหล่งบำบัดน้ำเสีย แบบตะกอนเร่ง (activated sludge) (Table 9) ผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในระหว่างการเจริญแล้วปล่อยออกมาออกเซลล์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะผลิตสารตกตะกอนชีวภาพที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน เช่น ลิปิด ไกลโคโปรตีน ไกลโคลิปิด โปรตีน และพอลิแซคคาไรด์ ส่งผลให้มีค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่แตกต่างกันด้วย (Gao *et al.*, 2006) Li และคณะ (2008) ศึกษาสารตกตะกอนชีวภาพชนิด exopolysaccharide ที่ผลิตจาก *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 ที่แยกได้จากตะกอนในทะเลลึก ซึ่งมีลักษณะคล้ายแบคทีเรีย มีค่าการตกตะกอนเท่ากับ 49.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดลองในสารละลายดินขาวซึ่งเติมด้วย  $\text{CaCl}_2$  4.55 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแคทไอออนชนิด  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{2+}$  มีผลต่อการตกตะกอนได้ดีกว่า  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  ที่ salinity 5-100% หรือที่อุณหภูมิ 5-15 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมการตกตะกอนเกิดขึ้นในช่วงพีเอช 5-8 โดยส่วนใหญ่สารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ มักเป็นกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน ไกลโคโปรตีน และอื่นๆ (Yokoi *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีสารตกตะกอนชีวภาพที่ได้จากพืชและแหล่งทางชีวภาพอื่นๆ อีกที่ได้มีการสนใจนำมาใช้ เช่น วัสดุเศษเหลือและของเสียจากเกษตรกรรมสามารถนำกลับมาใช้ใหม่เป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ตัวอย่างเช่น การนำไคโตซานซึ่งได้จากของเสียจากกระบวนการผลิตอาหารทะเลจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (Knorr, 1991) โดย Yokoi และคณะ (2002) ศึกษาการตกตะกอนชีวภาพของสารละลายเพคติน (pectin) ที่แยกได้จากแอปเปิ้ลในสารละลายดินขาว (kaolin clay) สาร activated carbon และสารละลายอินทรีย์ เช่น เซลลูโลส และยีสต์ พบว่ามีกิจกรรมการตกตะกอนเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเติมสารละลายเพคติน 30 มิลลิกรัมต่อลิตรและใช้แคทไอออน  $\text{Fe}^{3+}$  0.2 มิลลิโมลาร์ โดยกิจกรรมการตกตะกอนเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส

## 9.1 หลักการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพ

โดยทั่วไปการเกิดกลไกการตกตะกอนในระบบคอลลอยด์ (colloidal system) อาศัยกลไก 4 วิธี คือ การลดความหนาของชั้นกระจาย (diffuse layer), การดูดติดและการทำลายประจุไฟฟ้าของอนุภาคคอลลอยด์ (adsorption/charge neutralization), การใช้ผลึกสารอินทรีย์เพิ่ม

น้ำหนักและขนาดของอนุภาคคอลลอยด์ และการใช้สารพอลิเมอร์เป็นสะพานเชื่อม (bridging) ซึ่ง  
 ทั้ง 4 วิธีมีหลักการเดียวกัน คือ ทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ สำหรับการใส่สาร  
 ตกตะกอนชีวภาพมีกลไกการตกตะกอน 2 วิธีคือ การสร้างสะพานเชื่อมหรือการยึดเกาะ (bridging)

Table 9. Some of the bioflocculant-producing microorganisms

Microorganism	References
<i>Klebsiella</i> sp.	Dermlim <i>et al.</i> , 1999
<i>Arcuadendron</i> sp.	Lee <i>et al.</i> , 1995
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Kwon <i>et al.</i> , 1996
<i>Oscillatoria</i> sp.	Bender <i>et al.</i> , 1994
<i>N. amarae</i>	Takeda <i>et al.</i> , 1992
<i>Nocardia restricta</i>	Tong <i>et al.</i> , 1999
<i>Nocardia calcarea</i>	Tong <i>et al.</i> , 1999
<i>Nocardia rhodni</i>	Tong <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces griseus</i>	Shimofuruya <i>et al.</i> , 1996
<i>Streptomyces vinaceus</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>R. erythropolis</i>	Kurane <i>et al.</i> , 1986a, 1991, 1994a,b, 1995; Takeda <i>et al.</i> , 1991b
<i>Acinetobacter</i> sp.	Kurane and Matsuyama, 1994
<i>Alc. Latus</i>	Kurane and Nohata, 1991, 1994
<i>Alcaligenes cupidus</i>	Toeda and Kurane, 1991
<i>Alcaligenes faecalos</i>	Shimiziu, 1985
<i>Corynebacterium hhydrocarbonacalastus</i>	Zajic and Knetting, 1971
<i>Corynebacterium brevicale</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Dematinum</i> sp.	Tong <i>et al.</i> , 1999
<i>Mycobacterium phlei</i>	Misra, 1993
<i>Pseudomonas</i> sp.	Tago and Aida, 1977
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Pseudomonas fluorescent</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Bacillus</i> sp.	Kim, 1993; Suh <i>et al.</i> , 1997; Seo, 1993; Salehizadeh <i>et al.</i> , 2000; Yokoi <i>et al.</i> , 1995, 1996

---

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Sousa <i>et al.</i> , 1992
<i>K. cryocrescens</i>	Kakii <i>et al.</i> , 1990
<i>Z. ramigera</i>	Norberg and Enfors, 1982

---

Table 9. (Continued)

---

Microorganism	References
---------------	------------

---



---

<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	Tong <i>et al.</i> , 1999
<i>Flavobacterium</i> sp.	Endo <i>et al.</i> , 1976; Hantula and Bamford, 1991a,b
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Fumio, 1991
<i>Brevibacterium insectiphilum</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Phormidium</i> sp.	Bar-Or and Shilo, 1987
<i>Anabaenopsis circularis</i>	Levy <i>et al.</i> , 1992; Bar-Or and Shilo, 1987
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	Takagi and Kadowaki, 1985
<i>Calothrix desertica</i>	Bar-Or and Shilo, 1987
<i>Oscillatoria</i> sp.	Bender <i>et al.</i> , 1994
<i>Circinella sydowi</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Aspergillus sojae</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976a,b,c,d
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1976
<i>Aspergillus</i> sp.	Nam <i>et al.</i> , 1996
<i>Eupenicillium crustaceus</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Monascus anka</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Geotrichum candidum</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Sordaria fimicola</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1976d
<i>Paecilomyces</i> sp.	Takagi and Kadowaki, 1985
<i>Hansenula anomala</i>	Nam <i>et al.</i> , 1996
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saito <i>et al.</i> , 1990
<i>Saccharomyces diataticus</i>	Guirand, 1992
<i>Enterobacter</i> sp.	Yokoi <i>et al.</i> , 1996a; Kurane and Matsuyama, 1994
<i>Oerskovia</i> sp.	Kurane and Matsuyama, 1994
<i>Agrobacterium</i> sp.	Kurane and Matsuyama, 1994

---

ที่มา : Salehizadeh และ Shojaosadati (2001)

กัันระหว่างอนุภาค และกลไกการทำให้เกิดสภาพเป็นกลาง (charge neutralization) สำหรับกลไกแรกนั้น โมเลกุลของสารตกตะกอนชีวภาพสามารถเกาะติดบนอนุภาคคอลลอยด์ได้หลายตำแหน่ง โดยการเกาะติดอาจเป็นผลเนื่องมาจากประจุที่ต่างกัน หรือเหมือนกันของสายพอลิเมอร์กับอนุภาค

คอลลอยด์ อนุภาคที่มีพอลิเมอร์เกาะติดอยู่โดยมีปลายอิสระไว้สำหรับเกาะบนอนุภาคอื่นสามารถจับตัวกับอนุภาคอื่นๆ โดยมีพอลิเมอร์เป็นสะพานเชื่อม ซึ่งการเชื่อมต่อด้วยพอลิเมอร์จะเกิดขึ้นเมื่อมีพอลิเมอร์และตำแหน่งว่างบนผิวอนุภาค ดังนั้นพอลิเมอร์จึงต้องมีขนาดใหญ่เพื่อให้สามารถใช้เป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคต่างๆ ได้ และสะพานดังกล่าวต้องแข็งแรงสามารถต้านทานแรงผลักระหว่างอนุภาค ด้วยเหตุนี้การสร้างฟล็อกด้วยวิธีการสร้างสะพานเชื่อมจึงต้องการพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ เป็นชนิดประจุลบหรือชนิดไม่มีประจุ สำหรับวิธีทำให้เกิดสภาพความเป็นกลางของประจุนั้นสารตกตะกอนชีวภาพซึ่งมีประจุไฟฟ้าตรงข้ามกับอนุภาคคอลลอยด์ทำให้สามารถดูดติด (absorbed) บนผิวอนุภาค และเกิดการเปลี่ยนประจุของอนุภาคคอลลอยด์ให้เป็นประจุตรงข้ามกับประจุเดิม (charge reversal) จึงมักใช้พอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเพื่อทำลายประจุลบของอนุภาคคอลลอยด์ โดยพอลิเมอร์ที่ใช้สามารถเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลไม่ได้เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดฟล็อก (floc) (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001; Shih *et al.*, 2001)

ตัวอย่างเช่น พอลิเมอร์ชนิดไกลโคโพรตีนจาก *B. subtilis* DYU1 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนอาศัยกลไกการตกตะกอนที่น่าจะเป็นไปได้ (Fig. 12) 2 แบบ คือ

(1) เกิดจากประจุลบที่ผิวของอนุภาคของดินขาว (kaolin) ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแคทไอออน (cation) อยู่ก็ส่งผลเกิดการเปลี่ยนประจुरอบๆ อนุภาคของดินขาวจากประจุลบเป็นประจุบวก ดังนั้นประจุลบของพอลิเมอร์จากหมู่คาร์บอกซิล ( $\text{COO}^-$ ) จากพอลิเมอร์ชีวภาพจะเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งประจุบวกของอนุภาคแขวนลอยของสารละลายดินขาว

(2) เกิดจากแคทไอออนที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนเข้าไปเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งประจุลบของหมู่คาร์บอกซิล ( $\text{COO}^-$ ) จากพอลิเมอร์ชีวภาพแล้วเกิดการเชื่อมต่อกันกับอนุภาคของดินขาว

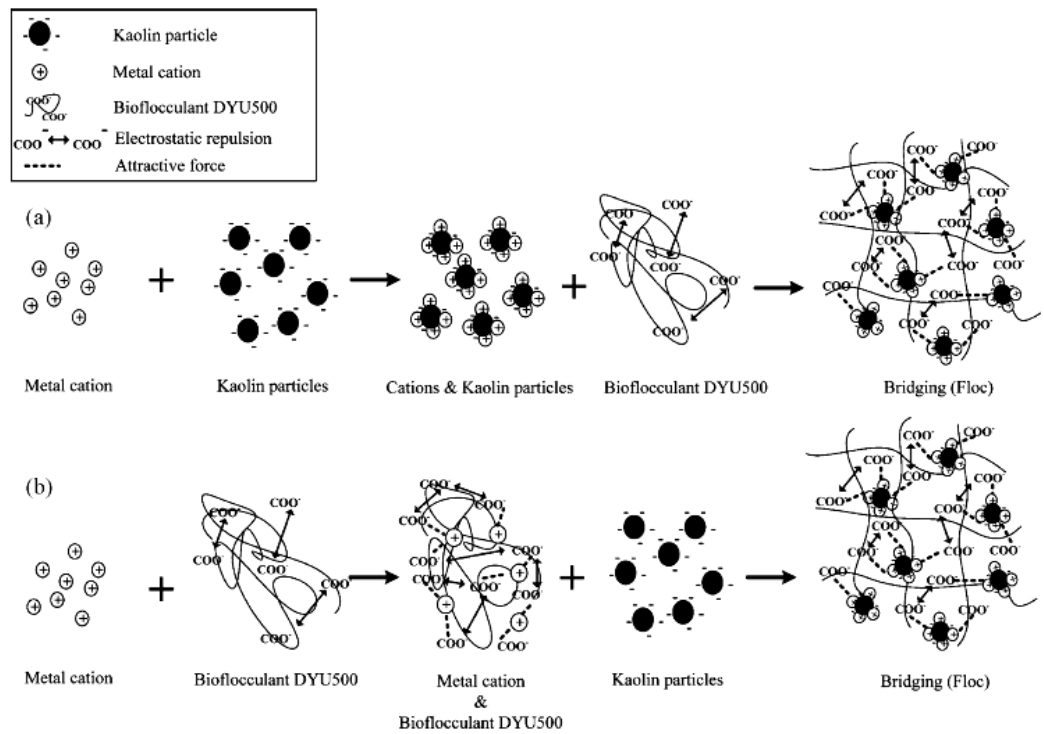


Figure 12. Mechanism of bioflocculation

ที่มา : Wu และ Ye (2007)

## 9.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของสารตกตะกอนชีวภาพ

### 9.2.1 น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของสารตกตะกอนชีวภาพ

จากรายงานการทดลองที่ผ่านมา พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตกตะกอนชีวภาพเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตกตะกอน ซึ่งขนาดของสารตกตะกอนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมของสารตกตะกอน มีการศึกษาโดยใช้พอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ซึ่งสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความสามารถในการดูดซับสารต่างๆ ได้สูงและความแข็งแรงในการยึดเกาะกับสารต่างๆ ได้มีประสิทธิภาพกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า สารตกตะกอนชีวภาพที่พบทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่  $10^5$  ถึง  $2.5 \times 10^6$  ดาลตัน (Yokoi *et al.*, 1996) สำหรับตกตะกอนสาร kaolin ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าสารตกตะกอนชีวภาพชนิดโปรตีนที่ผลิตโดย *Flavobacterium* sp. มีน้ำหนักโมเลกุล 140,000 ดาลตัน (Tong *et al.*, 1999) กิจกรรมการตกตะกอนสูงกว่าสารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจาก *H. anomala* J 224 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน และพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PY-90 มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $2 \times 10^6$  ดาลตัน ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 15 (Yokoi *et al.*, 1995) และพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมี

ค่าน้ำหนักโมเลกุล  $2.5 \times 10^6$  ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 125 (Yokoi *et al.*, 1997) เนื่องจากพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ย่อมมีพื้นที่สัมผัสและสามารถจับอนุภาคของแข็งได้มากกว่า จึงทำให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้มากกว่าพอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้พอลิเมอร์แต่ละชนิดซึ่งมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงมีผลทำให้ประจุรวมของโมเลกุลและหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลแตกต่างกันด้วย

### 9.2.2 พีเอช

ระดับพีเอชมีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพ อยู่ในช่วง 2-12 (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001) เช่น สารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจาก *A. sojiae* มีกิจกรรมการตกตะกอนเพิ่มสูงขึ้น (65) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชมากกว่า 7 (Nakamura *et al.*, 1996a) สารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจาก *Enterobacter* sp. BY-29 มีกิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด (33) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชเท่ากับ 3 และกิจกรรมการตกตะกอนจะลดลง (18) เมื่อมีพีเอชเพิ่มขึ้น (พีเอช 5-8) (Yokoi *et al.*, 1996) และสารตกตะกอนชีวภาพจาก *R. erythropolis* มีกิจกรรมการตกตะกอนดีที่สุดในพีเอชเป็นกลาง (พีเอช 7.0) (Kurane *et al.*, 1994b)

### 9.2.3 อุณหภูมิ

กิจกรรมการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพจะมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออยู่ในช่วง 4-50 องศาเซลเซียส สารตกตะกอนชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตจะให้กิจกรรมการตกตะกอนที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดและสารที่เป็นองค์ประกอบในสารตกตะกอนชีวภาพชนิดนั้น โดยโครงสร้างของสารตกตะกอนชีวภาพที่มีโปรตีนหรือเปปไทด์เป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างจะมีความสามารถในการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนที่อุณหภูมิไม่สูงมาก (น้อยกว่า 30 องศาเซลเซียส) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตกตะกอนชีวภาพที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้าง (Takagi and Kadowaki, 1985) *Bacillus* sp. DP-152 มีกิจกรรมการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูงโดยพบว่าเมื่อนำไปต้ม 15 นาที กิจกรรมการตกตะกอนจะมีอยู่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมการตกตะกอนเริ่มต้น (Subh *et al.*, 1997) ตัวอย่างสารตกตะกอนชีวภาพจาก *Aspergillus* sp. JS-42 ที่สามารถทนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้มากกว่า 1 ชั่วโมง (Nam *et al.*, 1996)

### 9.2.4 ชนิดของอิมูนและความเข้มข้นของโลหะ

ชนิดของอิมูนบวกและความเข้มข้นที่ใช้ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันเนื่องจากประจุลบที่อยู่ผิวของดินขาวหรืออนุภาคของของแข็งต่างๆที่อยู่ในสารละลายแตกต่างกัน โดยผลจากการเติมอิมูนบวกลงไปการทดสอบจะทำให้เกิดการยึดเกาะกันระหว่างสารตกตะกอนชีวภาพและอนุภาคของแข็งจะจับแน่น

กันมากขึ้น ซึ่งแหล่งของไอออนบวกมีหลายชนิด เช่น KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O และ FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O เป็นต้น (Kwon *et al.*, 2001) สารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจาก *Enterobacter* sp. BY-29 มีกิจกรรมการตกตะกอนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเติม Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup> และ Ca<sup>2+</sup> (Yokoi *et al.*, 1996) และผลจากการศึกษาของ Prasertsan และคณะ (2006) พบว่า สารตกตะกอนชีวภาพชนิดพอลิแซคคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* WD7 โดยใช้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยดินขาวสูงที่สุด (105) เมื่อใช้ CaCl<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และระดับพีเอชที่เหมาะสมในการการตกตะกอนอยู่ในช่วง 2-8

### 9.3 การประยุกต์ใช้สารตกตะกอนชีวภาพ

#### 9.3.1 ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

ปัจจุบันได้มีการใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียระบบตะกอนเร่ง (activated sludge) โดยมีการศึกษาการใช้สารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจาก *Aspergillus sojae* AJ-7002 ในการกำจัดเซลล์จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น ในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมพบว่า มีกิจกรรมการตกตะกอนใกล้เคียงกับสารตกตะกอนชีวภาพอื่นๆ เช่น ferric chloride และ polyacrylamides (Nakamura *et al.*, 1976b) Gong และคณะ (2008) รายงานผลของการใช้สารตกตะกอนชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Serratia ficaria* แยกได้จากดิน โดยมีกิจกรรมการตกตะกอน 95.4 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายดินขาวในสภาวะที่เหมาะสม โดยเกิดกิจกรรมการตกตะกอนได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดอ่อน (5-7) และใช้ divalent cation (Ca<sup>2+</sup> และ Mg<sup>2+</sup>) ช่วยส่งเสริมในการเกิดกิจกรรม ในขณะที่สารกลุ่ม Al<sup>3+</sup> และ Fe<sup>3+</sup> ไม่มีกิจกรรมการตกตะกอนเกิดขึ้น และเมื่อวัดด้วย zeta potential พบว่า ประจุของสารที่เป็นกลางมีผลต่อการตกตะกอน และนอกจากนี้ยังศึกษาการตกตะกอนในน้ำทิ้งดังนี้คือ น้ำเสียจากแม่น้ำ น้ำเสียจากโรงงานผลิตเครื่องดื่ม น้ำเสียจากโรงงานชำแหละเนื้อ น้ำเสียจากโรงงานผลิตขอส้วมเหล็ก น้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ พบว่าสารตกตะกอนชีวภาพสามารถบำบัดโดยมีอัตราการกำจัดสีและค่าซีไอดีได้ถึง 99.9 และ 72.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าสารตกตะกอนเคมีทางการค้า และจากการศึกษาของ Kurane และ Nohata (1991) พบว่าการใช้สารตกตะกอนชีวภาพจาก *Alcaligenes latus* ผสมกับโคโคซานพบว่าสามารถลดสีของน้ำทิ้งได้ 94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้โคโคซานอย่างเดียว (41 เปอร์เซ็นต์) (Kurane and Nohata, 1991)

#### 9.3.2 ใช้ในการแยกน้ำมันที่เป็นอิมัลชันอยู่ในน้ำ

Takeda และคณะ (1991) ศึกษาการใช้แยกน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม พบว่าเมื่อใช้สารตกตะกอนชีวภาพที่ไม่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์

จาก *Alcaligenes latus* ทำให้น้ำมันเกิดการแยกชั้นที่มองเห็นได้ลอยอยู่บนผิวด้านบนทำให้สามารถแยกน้ำมันออกมาจากน้ำทิ้งได้ง่าย ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ค่า COD ในชั้นน้ำพบว่า มีค่า COD ลดลงจากเริ่มต้น 450 ppm เหลือ 235 ppm (Takeda *et al.*, 1991)

### 9.3.3 ใช้ในการเก็บเกี่ยวเซลล์และเศษเซลล์ออกจากน้ำหมัก

ปัจจุบันได้มีการนำเอาสารตกตะกอนชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม และในอุตสาหกรรมอาหารหมักเพิ่มมากขึ้น ซึ่งพบว่าเมื่อนำสารตกตะกอนชนิดพอลิแซคคาไรด์ จาก *B. coagulans* As-101 ไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์พบว่าได้เบียร์ที่มีคุณภาพดีมีความใสมากขึ้น เมื่อนำเอาไปใช้ในการเก็บเกี่ยวเซลล์และเศษเซลล์ในกระบวนการเก็บเกี่ยวเบียร์ พบว่ามีการจับตัวกับอนุภาคที่เป็นของแข็งและตัวเซลล์เกิดการรวมตัวกันเป็นตะกอนลอยสามารถแยกออกมาจากกระบวนการผลิตได้ง่ายด้วยกระบวนการกรองหรือการหมุนเหวี่ยง (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001)

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ โดยมีสองแนวทางคือ สกัดพอลิเมอร์ (เฮมิเซลลูโลส) จากน้ำทิ้งปาล์มโดยตรง กับการผลิตจากเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิเมอร์ได้
2. นำพอลิเมอร์ทั้งสองแหล่งมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ เพื่อเป็นการหาแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุ

##### 1. น้ำทิ้ง

ตัวอย่างน้ำนิ่งปาล์ม (sterilizer condensate) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเพิ่มเกียรติปาล์มน้ำมัน จังหวัดสตูล เก็บตัวอย่างในภาชนะขนาด 20 ลิตร กรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบางสองชั้นแล้วบรรจุในภาชนะขนาด 6 ลิตร ก่อนเก็บที่ห้อง -20 องศาเซลเซียส

##### 2. จุลินทรีย์

###### 2.1 เชื้อราที่ใช้ผลิตพอลิเมอร์

เชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 จากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เก็บรักษาเชื้อในจานอาหาร PDA ที่มีการเพิ่มยีสต์สกัด 0.3 % (PDA + 0.3 % yeast extract) (ดัดแปลงจาก Cha *et al.*, 2007) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 3 เดือน และถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลองเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

###### 2.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งของพอลิเมอร์

*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งทางห้องปฏิบัติการได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ซึ่งแยกเชื้อเหล่านี้ได้จากคนไข้ของโรงพยาบาล โดยเก็บเชื้อในอาหาร NA (Nutrient agar) ถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 3 เดือน และถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลองเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

###### 2.3 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพรีไบโอติก

*Lactobacillus acidophilus* TISTR 875 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 450 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)

- Potato dextrose broth (PDB) ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 และน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร (บริษัท Himedia)
- Sabouraud dextrose broth (SDB) ประกอบด้วย นิโอเปปโติน 10 และกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร (บริษัท Himedia)
- Yeast malt extract medium (YM) ประกอบด้วย กลูโคส 10, เปปโติน 5, ยีสต์สกัด 3 และมอลต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร (Kim *et al.*, 2003)
- Mushroom complete medium-1 (MCM-1) ประกอบด้วย กลูโคส 20, เปปโติน 2, ยีสต์สกัด 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.046,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 และ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัมต่อลิตร (Oh *et al.*, 2007)
- MCM-2 มีสูตรองค์ประกอบอาหารเหมือนกัน แต่ใช้ซูโครสแทนกลูโคส (ดัดแปลงจาก Oh *et al.*, 2007)
- SSY medium ประกอบด้วย ซูโครส 10, กลูโคส 5, กลีเซอรอล 1, yellow soybean 5, ยีสต์สกัด 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, KCl 0.5 และ  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 กรัมต่อลิตร (ดัดแปลงจาก Xiao *et al.*, 2004)

#### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ในการวิเคราะห์ค่าซีไอดี บีไอดี และสารฟีนอล รวมทั้งการวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติของพอลิเมอร์

#### อุปกรณ์

1. เครื่อง gel permeation chromatography (GPC) รุ่น PL-GPC บริษัท Tosoh
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32/32R บริษัท Universal 32R
3. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น HK-7E บริษัท Tokyo TOA Electronic
4. ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ซีไอดี
  - อุปกรณ์รีฟลักซ์ (Reflux apparatus) : ขวดรีฟลักซ์ทรงกลม (ขวดซีไอดี) ขนาด 250 มิลลิลิตร
  - อุปกรณ์ควบแน่นรีฟลักซ์ (condenser) ขนาด 300 มิลลิเมตร
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi



6. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น UML500 บริษัท Sanyo
7. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) รุ่น SS325 บริษัท Tomy
8. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น M.3525-1 บริษัท Lab Line Instrument
9. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co., Ltd.
10. เครื่องให้ความร้อน (hot plate) รุ่น HS 115 บริษัท Ika Labotechnic
11. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น RO 5 บริษัท Ika Labotechnic
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
13. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius
14. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
15. เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
16. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 series HPLC บริษัท Shimadzu
17. เครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP)

## วิธีการวิเคราะห์

### 1. การวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง (Mycelia dry weight)

กรองตัวอย่างน้ำทิ้งและเส้นใยปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผ่านผ้าขาวบางซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอน ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยบนผ้าขาวบางวางในจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ นำออกจากตู้อบใส่ในโถสุญญากาศ ตั่งทิ้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

### 2. การวัดการเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อโดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน เตรียมตัวอย่างโดยกรองเส้นใยผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นนำเส้นใยไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ชั่งตัวอย่างอบแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 30% และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติม

สารละลาย Acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เติม 95% Ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน (Van de loo, 1976; Chaplin and Kennedy, 1986) (ภาคผนวก ข)

### 3. การหาปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพที่เชื้อผลิตได้

แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,632 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนพอลิเมอร์ด้วยเอทานอลปริมาตร 4 เท่าของสารละลายที่ได้ แยกพอลิเมอร์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,632 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที อบตะกอนที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง วางให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก (Dermlim *et al.*, 1999)

### 4. การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ และน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์หาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ ในน้ำนิ่งปาล์มและพอลิเมอร์ชีวภาพได้แก่ น้ำตาลคาร์บอน 5 (ไซโลส แรมโนส และอะราบีโนส) และน้ำตาลคาร์บอน 6 (กลูโคส, ฟรุคโตส และกาแลคโตส) โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 series HPLC บริษัท Agilent ใช้คอลัมน์ Zorbax Carbohydrate (4.6 mm x 150 mm) ดีเทคเตอร์ที่ใช้คือ RI (refractive index) ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้ acetonitrile : water (75:25) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (Chaplin and Kennedy, 1986) (ภาคผนวก ข)

### 5. การวิเคราะห์แร่ธาตุชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในน้ำนิ่งปาล์ม ได้แก่ โพแทสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภาคผนวก ข)

### 6. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอย, สารฟีนอล และไนโตรเจนทั้งหมด

วิเคราะห์หาค่าซีโอดี (chemical oxygen demand, COD), ของแข็งทั้งหมด (total solid, TS), ของแข็งแขวนลอย (suspended solid, SS) และสารฟีนอลในน้ำนิ่งปาล์มโดยใช้วิธี

มาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเสีย (APHA, AWWA and WEF. 1998) วิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมด (A.O.A.C, 1990) (ภาคผนวก ข)

## 7. การวัดค่ากิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยของสารตกตะกอนชีวภาพ

การวัดกิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยในดินขาว โดยเตรียมสารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl จากนั้นนำสารละลายดินขาวที่ได้มา 4.65 มิลลิลิตรผสมกับ 0.1 มิลลิลิตรของสารตกตะกอนชีวภาพ หรือน้ำหมัก แล้วเติมสารละลาย  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 mM) 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยชดเชยความขุ่นด้วยน้ำกลั่นแทนสารตกตะกอนชีวภาพ (Gao *et al.*, 2006) คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอนโดยใช้สมการ

$$\begin{aligned} \text{กิจกรรมการตกตะกอน} &= \frac{1}{OD_s} - \frac{1}{OD_c} \\ \text{อัตราการตกตะกอน (\%)} &= \frac{OD_c - OD_s}{OD_c} \times 100 \end{aligned}$$

เมื่อ  $OD_c$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรของชุดควบคุม

$OD_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรของตัวอย่าง

## วิธีการทดลอง

### 1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม

#### 1.1 การเตรียมน้ำนิ่งป่าลุ่มเบื้องต้น (pretreat)

เตรียมตัวอย่างน้ำนิ่งป่าลุ่มโดยขั้นแรกกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกของแข็งและตะกอนหยาบออกจากน้ำนิ่งป่าลุ่ม ขั้นที่สองแยกน้ำมัน โดยการนำน้ำนิ่งป่าลุ่ม ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง ขั้นสุดท้ายนำไปหมุนเหวี่ยง (ความเร็ว  $3,632 \times g$  เป็นเวลา 20 นาที) เพื่อแยกตะกอนละเอียดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 4) ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 1.2 ผลของอัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำนิ่งป่าลุ่ม

ตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม (จากข้อ 1.1) ด้วยเอทานอล 95% โดยใช้อัตราส่วนเอทานอล 95% ต่อน้ำนิ่งป่าลุ่มเท่ากับ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ตั้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยง ( $3,632 \times g$  เป็นเวลา 20 นาที) ที่ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักพอลิเมอร์ที่ได้ และคำนวณผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้ต่อวัตถุดิบที่ใช้

### 1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์

ตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มโดยใช้เอทานอลทุกอัตราส่วนที่ระบุในข้อ 1.2 ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบผลการตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง (ผลในข้อ 1.2)

### 1.4 การเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม

เก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มในสถานะที่คัดเลือกได้จากข้างต้น จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ได้พอลิเมอร์สกัดหยาบ (crude polymer)

## 2. การแยกขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม

แยกขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยใช้เทคนิค gel filtration chromatography โดยนำพอลิเมอร์สกัดหยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วนและสถานะที่เหมาะสมจากวิธีการทดลองข้อ 1 มาแยกขนาดโมเลกุลพอลิเมอร์โดยผ่านคอลัมน์ gel filtration ชนิด Sephadex G-25 medium (molecular filtration rang 100 to 5,000 Da) โดยใช้คอลัมน์ขนาด 2.2 x 70 เซนติเมตร ความยาวเจล 54 เซนติเมตร ปริมาตรเจลทั้งหมด 205 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ว load คอลัมน์ด้วยสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราการไหล (flow rate) 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายพอลิเมอร์ที่แยกได้ในหลอดแก้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแบบแยกส่วน (fraction collector) จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ในแต่ละหลอดมาตรวจหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร แล้วนำสารละลายที่ได้ในแต่ละ peak ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry)

## 3. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073

เลี้ยงเชื้อ *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 บนอาหาร PDA ที่เติมยีสต์สกัด 0.3% นาน 7 วัน ตัดเส้นใยของเชื้อราในชั้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีขนาด 1.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น (Xiao *et al.*, 2004) ใส่ในอาหาร PDB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมไว้ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

ในการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเติมหัวเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด (PDBY, SDB, YM, MCM-1, MCM-2 และ SSY) ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า (ความเร็ว 150 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) นาน 18 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน วัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการข้อ 1 และผลิตพอลิเมอร์ที่ได้ตามวิธีการข้อ 3 คัดเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ทำให้การเจริญเร็วและให้การผลิตพอลิเมอร์สูงสุด ไปใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 4. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์ม

##### 4.1 การวิเคราะห์ลักษณะของน้ำนิ่งปาล์ม

วิเคราะห์ลักษณะของน้ำนิ่งปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยนำมาผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ โดยกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนชิ้นใหญ่ แล้วนำไปวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์ค่าซีไอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอย ในโตรเจนทั้งหมด น้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ไซโลส แรมโนส อะราบีโนส และฟรุคโตส วิเคราะห์ค่าแร่ธาตุชนิดต่างๆ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก สารประกอบฟีนอลิก (ดัดแปลงจาก APAH, AWWA and WCPF, 1998)

##### 4.2 การเลี้ยงเชื้อราในน้ำนิ่งปาล์ม

###### 4.2.1 การคัดเลือกระดับความเข้มข้นน้ำทิ้งในอาหารแข็งน้ำนิ่งปาล์ม

เจือจางน้ำนิ่งปาล์มเจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่ระดับความเจือจาง 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3 เติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมเป็นอาหารแข็ง กระตุ้นการเจริญของเชื้อเริ่มต้นโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA ที่เติมยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน ตัดเส้นใยของเชื้อราในชั้นวุ้นขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร บริเวณขอบโคโลนี (โสภารวรรณ รัตนพันธ์, 2547) แล้วเติมลงในอาหารแข็งน้ำนิ่งปาล์มที่ระดับความเจือจางต่างๆ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยเจริญ สังเกตและบันทึกการเจริญของเส้นใยและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุกๆวันเป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกน้ำนิ่งปาล์มที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้

###### 4.2.2 ผลของความเข้มข้นสารอินทรีย์ในน้ำนิ่งปาล์ม

น้ำนิ่งปาล์มเจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่ระดับความเจือจาง 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3 แบ่งใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พลาสติกละ 50 มิลลิลิตร คำนวณค่าซีไอดีแต่ละความเจือจาง เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยตัดเส้นใยที่กำลังเจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน บริเวณขอบโคโลนีขนาด 1.5 ตาราง

เซนติเมตร จำนวน 2 ชั้น (Xiao *et al.*, 2004) ลงในพลาสติกที่บรรจุอาหาร PDB ที่เติมยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10% (v/v) ลงในพลาสติกที่บรรจุน้ำนิ่งปาล์มแต่ละความเจือจางบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าพีเอช และค่าซีไอดี เลือกระดับน้ำทิ้งที่เชื้อสามารถเจริญได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 4.2.3 การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 ในอาหาร PDA ที่เติมยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ตัดเส้นใยของเชื้อราในชั้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีขนาด 1.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ชั้น ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมไว้ใน พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำนิ่งปาล์มที่ระดับความเจือจางที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.2 แล้วปรับพีเอชจากเริ่มต้นจาก 5.0 เป็น 6.2 (Kim *et al.*, 2003) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน สุ่มตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นและทุกๆ 3 วัน เพื่อวัดพีเอช ปริมาณพอลิเมอร์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ค่าซีไอดี และการเจริญของเชื้อ โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนและเปรียบเทียบกับปริมาณเส้นใยแห้ง

#### 4.2.4 การเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์มและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

นำน้ำนิ่งปาล์มที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อรามาหมุนเหวี่ยง (ความเร็ว  $3,632 \times g$  นาน 20 นาที) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดของแข็ง นำน้ำหมักที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 4 เท่าของของเหลว ใช้แท่งแก้วคนตัดพอลิเมอร์แยกออกมา แล้วนำมาละลายด้วยน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (deionized water) แล้วนำสารละลายพอลิเมอร์ไปหมุนเหวี่ยง (ความเร็ว  $3,632 \times g$  นาน 20 นาที) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำออก (Madla *et al.*, 2005) จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปทำไดอะไลซิส (dialysis) (molecular weight cut off 8,000 Da) ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ได้พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

## 5. ศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

### 5.1 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์

ทดสอบความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ในตัวทำละลายหลายชนิด โดยซึ่งพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 1 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร สังเกตการละลายของพอลิเมอร์หลังจากตั้งไว้ข้ามคืน โดยเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ไม่มีการเติมพอลิเมอร์ ตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ น้ำกลั่น DMSO เมทานอล เอทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม ไคลลอร์โรมีเทน เฮกเซน โพรพานอล ไอโซโพรพิลอีเทอร์ (Collins *et al.*, 1973)

### 5.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์

วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งปาล์มและจากเชื้อราโดยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) โดยใช้เทคนิค Pellet (KBr) สภาวะการทดสอบคือ ช่วงคลื่น  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเทคนิคทางด้าน Infrared Spectrometer มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล รวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### 5.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC)

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน 0.1 M Sodium nitrate พร้อมกับปั่นกววนสารละลายตัวอย่าง 1 คีน จากนั้นกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง GPC โดยใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel linear 1 column ที่สามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1,000-20,000,000 ดาลตัน สภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลองคือ ใช้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร (flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ 0.1 M sodium nitrate เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและใช้ฟลูออแลน (น้ำหนักโมเลกุล 5,900-788,000 ดาลตัน) เป็นพอลิเมอร์มาตรฐาน และใช้ Refractive Index Detector (RI detector) เป็นดีเทคเตอร์ หลักการทำงานของเครื่องคือ แยกพอลิเมอร์ตามขนาดโมเลกุล สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งต่อไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อนำไปประมวลผลต่อไป ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

## 5.4 องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพ (การวิเคราะห์เชิงปริมาณ)

### 5.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยปฏิกิริยา Phenol sulfuric acid ของพอลิเมอร์ แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยนำสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟีนอล 100 ไมโครลิตร (ละลายฟีนอลในน้ำความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)) และน้ำปริมาตร 600 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว วางทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากันอย่างรุนแรง วางทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส โดยในการทดลองนี้ใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Chaplin and Kennedy, 1986)

### 5.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid assay

ดูดสารละลายพอลิเมอร์ชีวภาพ สารละลายน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส และสารละลายควบคุม (น้ำ) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (Chaplin and Kennedy, 1986)

### 5.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลางด้วยวิธี Anthrone reaction

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส วิธีการคือ นำสารละลายแอนโทรน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่เย็นทันที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง (Chaplin and Kennedy, 1986)

### 5.4.4 การวิเคราะห์หาน้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) ด้วยวิธี Ferric-orcinol assay

ดูดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานไซโลส สารละลายพอลิเมอร์ชีวภาพ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายควบคุม (น้ำ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A (สารละลาย Trichloroacetic acid ในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 10% (w/v)) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว เติมสารละลาย B (สารละลาย Ferric ammonium sulphate ความเข้มข้น 1.15% (w/v) และเตรียม orcinol ความเข้มข้น 0.2% (w/v) ใน 9.6 M HCl) ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี



นำไปต้มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส (Chaplin and Kennedy, 1986)

#### 5.4.5 การวิเคราะห์หาน้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ด้วยวิธี L-cysteine hydrochloride assay

ดูดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส สารละลายพอลิเมอร์ชีวภาพความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายควบคุม (น้ำ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย B (L-cysteine hydrochloride (700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว แล้วผสมให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำแข็ง นำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (Chaplin and Kennedy, 1986)

#### 5.4.6 การวิเคราะห์หากรดยูโรนิก วิเคราะห์โดยวิธี Carbazole-sulfate reaction

สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เติม reagent A (ผสม sodium tetraborate decahydrate 0.95 กรัม, น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริก 98 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและแช่ในอ่างน้ำแข็ง) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และแช่เย็นทันที ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่เย็นทันที เติม reagent B (ผสม carbazole 125 มิลลิกรัม และ absolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นลง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน glucuronic acid lactone (Chaplin and Kennedy, 1986)

### 5.5 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์

#### 5.5.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

ไฮโดรไลซิสพอลิเมอร์ ด้วย 3 M Trifluoroacetic acid โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของพอลิเมอร์เป็น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยไประเหยเอากรดออกจนแห้ง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นนำมาปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วย 1 N NaOH โดยปริมาตรสุดท้ายต้องไม่เกิน 5 มิลลิลิตร กรองสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้มาหยดบนแผ่น TLC aluminium sheet silica gel 60 F<sub>254</sub> ชนิด normal phase ปริมาณ

0.05 ไมโครลิตร โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ไซโลส ฟรุคโตส แมนโนส แรมโนส และอะราบิโนส ในปริมาณที่เท่ากัน นำแผ่น TLC แฉใน TLC chamber ซึ่งใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ isopropyl alcohol : ethyl acetate : dH<sub>2</sub>O (3:3:1 โดยปริมาตร 10 มิลลิลิตร) เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระยะทางที่กำหนดไว้แล้ว เป่าให้แห้ง หลังจากนั้นพ่นด้วย N-(1-naphthyl ethylene diamine) 0.3 กรัม ในกรดซัลฟูริก 5 เปอร์เซ็นต์ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 มิลลิลิตรใน methanol 100 มิลลิลิตร) และนำมาตรวจสอบการเกิดสีด้วยความร้อน โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จนเห็นจุดสีบนแผ่น TLC วัดระยะที่น้ำตาลและตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้แล้วนำมาคำนวณหาค่า R<sub>f</sub> เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ (ดัดแปลงจาก Selbmann *et al.*, 2002; Kim and Yun, 2005; Methacanon *et al.*, 2005; Bundaipet and Prasertsan, 2006)

$$\text{ค่า Rf} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

### 5.5.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารละลายพอลิเมอร์ที่ผ่านการย่อยด้วย 2 M Trifluoroacetic acid เป็นเวลา 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำตาลโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Aminex HPX-87H column (7.8 mm x 300 mm) ดีเทคเตอร์ที่ใช้คือ RI (refractive index) ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยอัตราเร็ว 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่แยกออกมาได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับน้ำตาลมาตรฐาน (กลูโคส ไซโลส ไรโบส และอะราบิโนส) หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีก (peak) ต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณของสารในแต่ละพีกได้โดยวัดความสูงของพีก (peak height) เทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ และวัดพื้นที่พีก (peak area) เทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป

## 6. คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

### 6.1 การทดสอบการทนต่อการย่อยในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร

เตรียมตัวอย่างพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (HCl buffer) ความเข้มข้น 0.14 โมลาร์ ที่ระดับ

พีเอช 1, 2 และ 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลาร์ คัดแปลงจาก Korakli และคณะ (2002 อ้างโดย นิรัญญา บุญดี, 2550) เติมน้ำตาลละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างพอลิเมอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมาบ่มพร้อมทั้งเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric acid method และน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Copper-bicinchoninate (Fox and Robyt, 1991 อ้างโดย นันทินา เชิญทอง, 2550) (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโดย

$$\text{Hydrolysis (\%)} = \frac{\text{Reducing sugar release (final-initial sugar)} \times 100}{\text{Total sugar content - initial reducing sugar before acid digestion}}$$

Total sugar content – initial reducing sugar before acid digestion

คัดเลือกสารสกัดที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อย (Hydrolysis) ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 6.2

### 6.2 การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic $\alpha$ -amylase

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์ให้มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการย่อยโดยกรดที่พีเอช 1 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วปรับพีเอชให้เป็น 6.9 โดยใช้ 1 M NaOH จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครไทดเตอร์เพลท เติมน้ำเอนไซม์ human pancreatic  $\alpha$ -amylase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างเริ่มต้นและที่เวลา 6 ชั่วโมง คัดแปลงจาก Doyle และคณะ (1999 อ้างโดย Wichienchot, 2005) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโดยเอนไซม์ human pancreatic  $\alpha$ -amylase เช่นเดียวกับข้อ 6.1

คัดเลือกพอลิเมอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์ hydrolysis ต่ำ เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

### 6.3 ผลของการใช้พอลิเมอร์ต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

ทำการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium (ภาคผนวก ก) ที่มีพอลิเมอร์และน้ำตาลกลูโคส (positive control) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหาร minimal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน (negative control) เลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกซึ่งอยู่ในระยะ log phase เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในอาหาร MRS เติมน้ำตาลที่เรียก

โปรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเป็น  $10^7$  CFU/ml นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ (เลี้ยงเชื้อโดยใช้ขวดยางที่ปิดด้วยฝาอลูมิเนียม มีการพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศที่อยู่ภายในขวด) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยหาจำนวนเชื้อ โดยการ pour plate ในอาหาร MRS agar วัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก และวัดปริมาณการใช้พอลิเมอร์หลังจากการหมักโดยการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol sulfuric methods (Fook and Gibson, 2003) แล้วรายงานผลเป็นร้อยละของการนำพอลิเมอร์ไปใช้โดยเปรียบเทียบที่เวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการเจริญ โดยคำนวณปริมาณสารพอลิเมอร์ที่ถูกใช้ไปดังนี้

$$\text{ร้อยละของการใช้พอลิเมอร์} = \frac{\text{พอลิเมอร์เริ่มต้น} - \text{พอลิเมอร์สุดท้าย}}{\text{พอลิเมอร์เริ่มต้น}} \times 100$$

## 7. คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนในสารละลายดินขาว

นำสารละลายดินขาว (kaolin clay) 4.65 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 มิลลิลิตรของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม (SC-S และ SC-L) และ *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์ม (EPS BCC2073) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kwon *et al.*, 2001) แล้วเติมสารละลาย  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (40 มิลลิโมลาร์) 0.25 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะพีเอช 7.0 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง คูณสารละลายส่วนบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารตกตะกอนชีวภาพ (Kwon *et al.*, 2001) คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอน

## 8. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพ

### 8.1 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ชีวภาพ

นำพอลิเมอร์ที่เหมาะสม (จากข้อ 7) 0.1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 2 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกับสารละลายดินขาว 4.65 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไอออนโลหะ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 4.5 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารตกตะกอนชีวภาพ (Prasertsan *et al.*, 2006) คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอน

## 8.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของไอออนโลหะ

นำสารละลายดินขาว 4.65 มิลลิลิตรผสมกับ 0.1 มิลลิลิตรของสารตกตะกอนชีวภาพที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 8.1) แล้วเติมสารละลาย KCl, NaCl,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารตกตะกอนชีวภาพ (Prasertsan *et al.*, 2006) คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอน

## 8.3 ผลของพีเอช

นำสารละลายดินขาวที่มีการปรับพีเอชเป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 (โดยใช้ 1 M NaOH และ HCl) ใช้ปริมาตร 4.65 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 มิลลิลิตรของสารตกตะกอนชีวภาพที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 8.1) แล้วเติมสารละลายไอออนโลหะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 8.2) 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารตกตะกอนชีวภาพ (Prasertsan *et al.*, 2006) คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอน

## 9. สภาพที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพโดยใช้ Response surface methodology (RSM)

ในการออกแบบพื้นผิวผลตอบสนอง การทดลองนี้เลือกใช้การออกแบบส่วนประสมกลาง (central composite design, CCD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก factorial  $2^k$  โดยเพิ่มการทดลองในแนวแกนและที่จุดศูนย์กลาง สำหรับการทดลองนี้มีตัวแปรต้น 3 ตัวแปร โดยใช้ตัวแปรจากการผลการทดลองในข้อ 8 คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ชนิดและความเข้มข้นของไอออนโลหะ และค่าพีเอช ที่คัดเลือกได้ ซึ่งช่วงของความเข้มข้นที่เลือกครอบคลุมจากผลการทดลองในข้อ 8.1-8.3 โดยแปรระดับของตัวแปรอิสระ 5 ระดับ ประกอบด้วย -1.0, -0.5, 0, 0.5 และ 1.0 ดังแสดงใน Table 10 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด ดังนั้นตัวแปรตามในการทดลอง คือ กิจกรรมการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพ (1/OD) ใช้การทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง โดยศึกษาค่าต่ำสุดและสูงสุดของแต่ละปัจจัย (Table 10) ได้แก่ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ (0 และ 10.04 กรัมต่อลิตร), ความเข้มข้นของแคทไอออน (0.39 และ 2.41 มิลลิโมลาร์) และค่าพีเอช (2.98 และ 8.02)

ศึกษาสภาวะกิจกรรมการตกตะกอนของสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่คัดเลือกได้ที่มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์, โลหะแคทไอออน และช่วงของค่าพีเอช แสดงใน Table 11 โดยใช้สารละลายดินขาวความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 4.65 มิลลิลิตร เติมสารละลายพอลิเมอร์ 0.1 มิลลิลิตร สารละลายโลหะแคทไอออน 0.25 มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิเมอร์)

เมื่อทำการทดลองตามที่ออกแบบแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้ Design Expert Version 5.0.8 (Stat Ease Corporation, MN) เนื่องจากวิธีการพื้นผิวตอบสนองให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถแสดงในแบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ แสดงดังสมการ (Myers, 1995)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} \chi_i \chi_j$$

โดย  $\beta_{ij}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยโดย  $i$  และ  $j$  คือ ลำดับของตัวแปร

Table 10. Independent variables and their factor levels.

Independent variable	symbol	code factor levels				
		- 1.0	- 0.5	0	0.5	1.0
Polymer concentration (g/L)	$X_1$	-0.05	2.00	5.00	8.00	10.04
Cation concentration (mM)	$X_2$	0.39	0.80	1.40	2.00	2.41
pH	$X_3$	2.98	4.00	5.50	7.00	8.02

Table 11. Central composite design matrix defining polymer concentration ( $X_1$ ), cation concentration ( $X_2$ ) and pH ( $X_3$ ) on flocculation activity.

Trials	Parameters		
	$X_1$ (g/L)	$X_2$ (mM)	$X_3$
1	2.00 (-0.5)	0.80 (-0.5)	4.00 (-0.5)
2	8.00 (0.5)	0.80 (-0.5)	4.00 (-0.5)
3	2.00 (-0.5)	2.00 (0.5)	4.00 (-0.5)
4	8.00 (0.5)	2.00 (0.5)	4.00 (-0.5)
5	2.00 (-0.5)	0.80 (-0.5)	7.00 (0.5)
6	8.00 (0.5)	0.80 (-0.5)	7.00 (0.5)
7	2.00 (-0.5)	2.00 (0.5)	7.00 (0.5)
8	8.00 (0.5)	2.00 (0.5)	7.00 (0.5)
9	-0.05 (-1.0)	1.40 (0)	5.50 (-1)
10	10.04 (1.0)	1.40 (0)	5.50 (0)
11	5.00 (0)	0.39 (-1.0)	5.50 (0)
12	5.00 (0)	2.41 (1.0)	5.50 (0)
13	5.00 (0)	1.40 (0)	2.98 (-1.0)
14	5.00 (0)	1.40 (0)	8.02 (1.0)
15	5.00 (0)	1.40 (0)	5.50 (0)

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม

##### 1.1 ผลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งป่าลุ่ม

จากการตกตะกอนน้ำนิ่งป่าลุ่มด้วยเอทานอล (95%) โดยใช้อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งป่าลุ่มเท่ากับ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 (ให้ปริมาตรน้ำนิ่งป่าลุ่มคงที่) โดยปริมาตร ตั้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเติมเอทานอลลงในน้ำนิ่งป่าลุ่ม พอลิเมอร์จะลอยรวมตัวกันและตกตะกอนลงสู่ก้นภาชนะ โดยในชั่วโมงแรกจะมีการตกของพอลิเมอร์อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นพอลิเมอร์จะมีอัตราการตกตะกอนช้าลง และการตกตะกอนของพอลิเมอร์เริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาผลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งป่าลุ่ม จาก Figure 13 พบว่า เมื่อเติมปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น ปริมาณพอลิเมอร์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากพอลิเมอร์เป็นชนิดเฮมิเซลลูโลสสามารถละลายน้ำได้ โดยโมเลกุลของพอลิเมอร์จะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำ ดังนั้นเมื่อเติมเอทานอลลงไป เอทานอลจะเข้าไปจับกับน้ำโดยสร้างพันธะไฮโดรเจน เนื่องจากเอทานอลมีรูปร่างคล้ายโมเลกุลของน้ำ หรือกล่าวได้ว่าเป็นอนุพันธ์หนึ่งของน้ำ ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งมีขั้วชอบน้ำ (hydrophilic) (พิมพีจิต ดามพวรรณ, 2536) ทำให้โมเลกุลของน้ำถูกดึงออกจากโมเลกุลของพอลิเมอร์ พอลิเมอร์จึงตกตะกอนลงมา และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเอทานอลสูงขึ้น ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพก็สูงขึ้นเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า พอลิเมอร์ชีวภาพมีโครงสร้างขนาดใหญ่ทำให้เอทานอลเข้าแย่งจับกับน้ำได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอทานอลสูงกว่าที่อัตราส่วนเท่ากับ 4.0 ปริมาณพอลิเมอร์มีแนวโน้มคงที่ โดยพอลิเมอร์ที่ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องที่อัตราส่วนเท่ากับ 4.0, 5.0 และ 6.0 ได้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 11.00, 12.05 และ 12.40 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้ที่อัตราส่วนเท่ากับ 5.0 และ 6.0 พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) (Table 12)



## 1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์

ทำการตกตะกอนพอลิเมอร์โดยใช้อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งปาล์มทุกอัตราส่วน (ในข้อ 1.1) มาทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถตกตะกอนพอลิเมอร์ได้ดีกว่าอุณหภูมิห้องเพียงเล็กน้อย โดยให้ปริมาณพอลิเมอร์เท่ากับ 12.85 และ 12.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งปาล์มเท่ากับ 6.0 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตกตะกอนพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) (Table 12) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนิ่งปาล์มเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิห้องในการตกตะกอนพอลิเมอร์เพื่อลดปริมาณเอทานอลที่ใช้

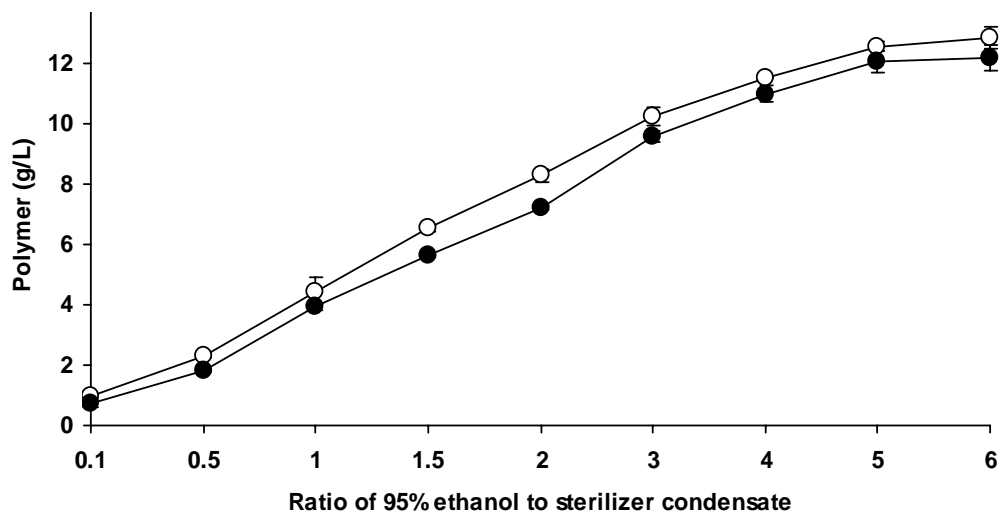


Figure 13. Effect of ethanol to sterilizer condensate of palm oil mill ratio and temperature on yield of the polymers obtained after precipitation at room temperature (●) and 4°C (○). The results were expressed as the average of triple determinations and error bars indicate standard deviations

Table 12. Effect of ethanol to sterilizer condensate of palm oil mill ratio and temperature on yield of the polymers obtained after precipitation

Ratio of 95% Ethanol to sterilizer condensate of palm oil mill (L/L)	Biopolymer (g/L)**	
	Room temperature (~30±2°C)	4°C
0.1	0.82 ± 0.14 <sup>aA</sup>	0.81 ± 0.42 <sup>aA</sup>
0.5	1.80 ± 0.05 <sup>bB</sup>	2.33 ± 0.07 <sup>bC</sup>
1.0	3.95 ± 0.10 <sup>cD</sup>	4.45 ± 0.45 <sup>cE</sup>
1.5	5.62 ± 0.03 <sup>dF</sup>	6.52 ± 0.10 <sup>dG</sup>
2.0	7.20 ± 0.07 <sup>eH</sup>	8.30 ± 0.21 <sup>eI</sup>
3.0	9.78 ± 0.17 <sup>fJ</sup>	10.22 ± 0.31 <sup>fJ</sup>
4.0	11.00 ± 0.28 <sup>gK</sup>	11.52 ± 0.03 <sup>gL</sup>
5.0	12.05 ± 0.35 <sup>hLM</sup>	12.00 ± 0.14 <sup>gM</sup>
6.0	12.40 ± 0.42 <sup>hMN</sup>	12.85 ± 0.35 <sup>hN</sup>

\*\* Values are means of duplicate determinations with standard deviation. Different letters (a-h) mean significant differences ( $P < 0.05$ ) for the same column and the different letters (A-N) mean significant differences ( $P < 0.05$ ) for analysis between the column

## 2. การแยกขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์จากน้ำนึ่งปาล์ม

ทำการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนึ่งปาล์มในสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้างต้น คือ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำนึ่งปาล์มเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง จาก Figure 14a แสดงลักษณะของพอลิเมอร์ หลังจากตกตะกอนด้วยเอทานอล พบว่า มีการตกจมของตะกอนและมีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวขุ่น เมื่อนำพอลิเมอร์ที่ได้จากการตกตะกอนที่อัตราส่วนดังกล่าวไปทำแห้งโดยการ freeze dry พบว่าพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง เมื่อบดละเอียดจะมีลักษณะคล้ายผงดินขาว (Figure 14b) เมื่อนำพอลิเมอร์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย พบว่า ประกอบด้วยน้ำหนักโมเลกุลสองส่วน คือ พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็ก ( $M_p=1223$  คาลตัน) และพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ ( $M_p=2525$  คาลตัน) (ภาคผนวก ก) จึงทำการแยกขนาดพอลิเมอร์โดยใช้เทคนิค gel filtration chromatography ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน และพอลิแซคคาไรด์ โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดยใช้คอลัมน์ชนิด Sephadex G-25

medium หลังจากผ่านสารพอลิเมอร์ลงในคอลัมน์แล้วชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำแต่ละหลอดไปตรวจหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ออกมาจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร (Figure 15) พบว่า สารละลายพอลิเมอร์ถูกชะออกมา 2 peak คือ peak A ซึ่งเป็นกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขนาดใหญ่ (2525 คาลตัน) และ peak B คือ กลุ่มพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขนาดเล็ก (1223 คาลตัน) โดยพอลิเมอร์ขนาดโมเลกุลใหญ่จะออกจากคอลัมน์มาก่อนและตามด้วยขนาดโมเลกุลเล็ก โดยแยกได้ yield เท่ากับ 65.31% และ 12.82% ตามลำดับ ของพอลิเมอร์ทั้งหมดที่แยกผ่านคอลัมน์ จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำไดอะไลซิส (dialysis) (molecular weight cut off ขนาด 8,000 Da) ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย พอลิเมอร์ที่ได้ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ได้พอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยแทนสัญลักษณ์ของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก และโมเลกุลใหญ่ด้วย SC-S และ SC-L ตามลำดับ

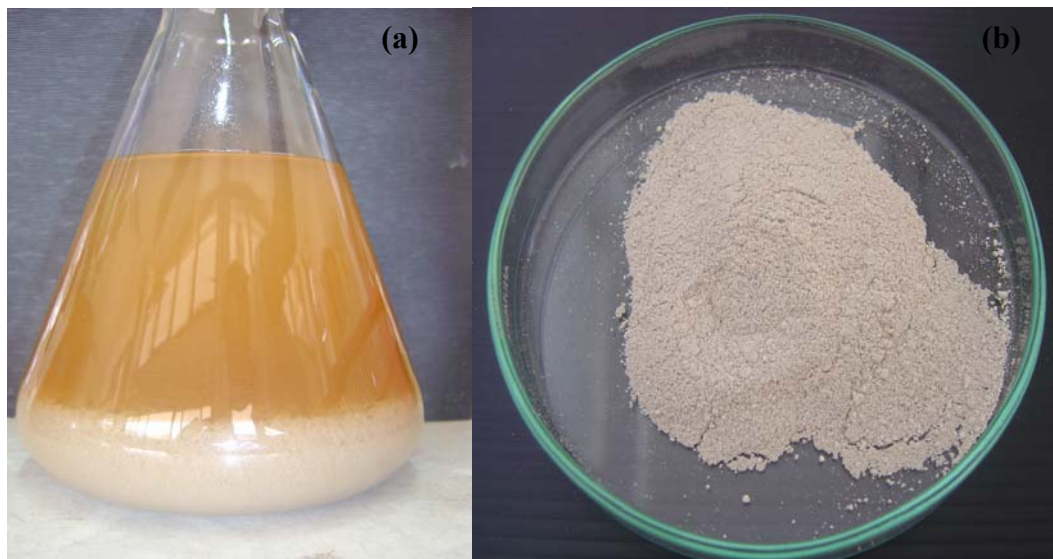


Figure 14. The appearance characteristics of polymers from sterilizer condensate of palm oil mill after precipitation with ethanol (a) and after freeze drying (b)

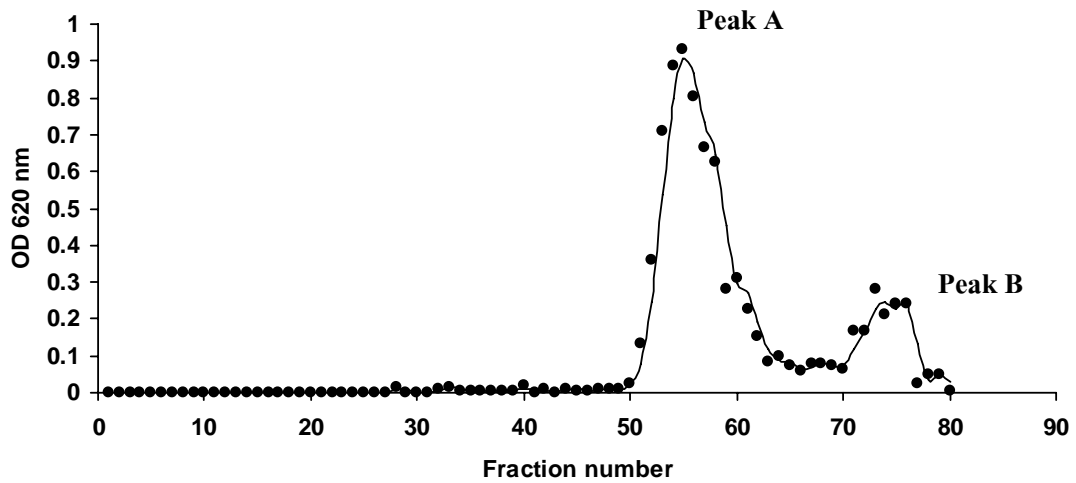


Figure 15. Gel filtration chromatography pattern of crude polymer (P-5.0) isolated from sterilizer condensate of palm oil mill. Sample were loaded onto a Sephadex G-25 medium column, resolved at a flowrate of 0.4 ml/min, and collected as 1 ml fractions. Peak A: large molecule, peak B: small molecule. The solid line represents the absorbance at 620 nm for carbohydrates

### 3. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073

ทำการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ 6 ชนิด คือ PDB, YM, SDB, MCM-1, MCM-2 และ SSY medium ต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงบนเครื่องเขย่า (150 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงมาวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเมอร์ที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% และค่าพีเอช (Figure 16) และวิเคราะห์ค่าอัตราการผลิตพอลิเมอร์ (biopolymer productivity) ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้ต่อกรัมเซลล์ (biopolymer yield on cells) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) (Table 13) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีผลให้เชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 เจริญและผลิตพอลิเมอร์ได้ดีที่สุด มีค่าสูงสุดเท่ากับ  $11.70 \pm 0.01$  และ  $3.37 \pm 0.37$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน (Figure 16a, 16b) และมีอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.281 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยลำดับรองลงไปตามลำดับ คือ YM, SDB, MCM-2, MCM-1 และ SSY ในอาหาร YM เชื้อเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยง 9 วัน ( $5.85 \pm 0.02$  กรัมต่อลิตร) และผลิตพอลิเมอร์สูงสุดในวันที่ 15 ของการเลี้ยง ( $0.64 \pm 0.09$  กรัมต่อลิตร) และมีอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.043 กรัมต่อ

ลิตรต่อวัน และในอาหาร MCM-1 และ MCM-2 ให้การเจริญและการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ  $3.72 \pm 0.13$ ,  $3.78 \pm 0.01$  (หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 15 และ 9 วัน ตามลำดับ) และ  $0.18 \pm 0.06$ ,  $0.21 \pm 0.12$  (หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน) กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.015 และ 0.017 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ สำหรับผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ SSY ต่อการเจริญและผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ พบว่า เชื้อใช้เวลาในการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับการเลี้ยงในอาหาร PDB คือ 12 วัน โดยมีค่าเท่ากับ  $2.34 \pm 0.01$  และ  $0.16 \pm 0.03$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.013 กรัมต่อลิตรต่อวัน สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหาร SDB ให้ค่าการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์สูงสุด ( $4.86 \pm 0.09$  และ  $0.69 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน ซึ่งใช้เวลาในการเลี้ยงนานที่สุด และมีอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.038 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ทั้งหกชนิดคือ PDB, YM, SDB, MCM-1, MCM-2 และ SSY medium ให้ผลผลิตที่ได้สูงสุดต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละอาหารเท่ากับ 0.288, 0.109, 0.142, 0.048, 0.054 และ 0.068 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อในแต่ละสูตรอาหาร (Figure 16c) พบว่า ในอาหาร PDB, YM และ SDB มีการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือพีเอชเพิ่มขึ้น โดยค่าพีเอชในอาหาร YM เพิ่มขึ้นจาก 5.22 เป็น 7.65 ในอาหาร PDB ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.91 เป็น 6.3 ในอาหาร SDB ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.35 เป็น 6.29 หลังจากการเลี้ยงครบ 21 วัน สำหรับในอาหาร MCM-1, MCM-2 และ SSY medium พีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.2-5.8 เมื่อพิจารณาลักษณะของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ พบว่า อาหารทั้ง 6 ชนิด มีลักษณะของน้ำหมักเหมือนกันคือใสขุ่นหนืด โดยในอาหาร PDB น้ำหมักมีความหนืดมากที่สุด ซึ่งความหนืดจะเพิ่มขึ้นเมื่อจุลินทรีย์หลั่งสารพอลิเมอร์ออกมา สอดคล้องกับรายงานการทดลองที่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งจุลินทรีย์หลั่งสารพอลิเมอร์ออกมาในน้ำหมัก ส่งผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้นจากรายงานของ Sankpal และคณะ (2001) พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. ความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นพร้อมกับปริมาณ dextran ที่เชื้อหลั่งออกมา และจากรายงานของ Kim และคณะ (2003) น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps militaris* C738 นาน 3 วัน และมีปริมาณพอลิเมอร์สูงสุดเมื่อเลี้ยงไป 10 วัน และความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดชี้ให้เห็นถึงปริมาณพอลิเมอร์สูงขึ้นด้วย ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของความหนืดกับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ชีวภาพ

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของแต่ละสูตรอาหาร พบว่า มีค่าแตกต่างกัน (Table 14) ซึ่งส่งผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ด้วยเช่นกัน จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 สามารถเจริญได้ในช่วงของอัตราส่วน

คาร์บอนต่อไนโตรเจนตั้งแต่ 6:1 ถึง 82:1 โดยอัตราที่ให้การเจริญและผลิตพอลิเมอร์ดีที่สุดคือ 10:1 (อาหาร PDB) จากการศึกษาของ Fasidi และ Olorunmaiye (1994) รายงานว่า เชื้อรา *Pleurotus tuber-regium* เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4:1 แต่ให้ผลผลิตของน้ำหนักรวมแห้งเท่ากับ 0.2 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตามยังคงไม่ทราบช่วงความกว้างของค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่จะเพิ่มผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีที่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลวที่แน่นจัด ส่วนการศึกษาของ Wu และคณะ (2004) โดยทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. tuber-regium* (Fr.) ในอาหารเหลวที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอัตราส่วนช่วง 18:1 ถึง 36:1 และอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ 24:1 สรุปว่า สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสังเคราะห์ทางชีวภาพของผนังเซลล์ (non-starch polysaccharide) ในเส้นใย และจากการศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา *Cordyceps sinensis* พบว่าให้การเจริญสูงสุดเมื่อปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12:1 โดยใช้น้ำตาลซูโครส และเปปโตน (Dong and Yao, 2005)

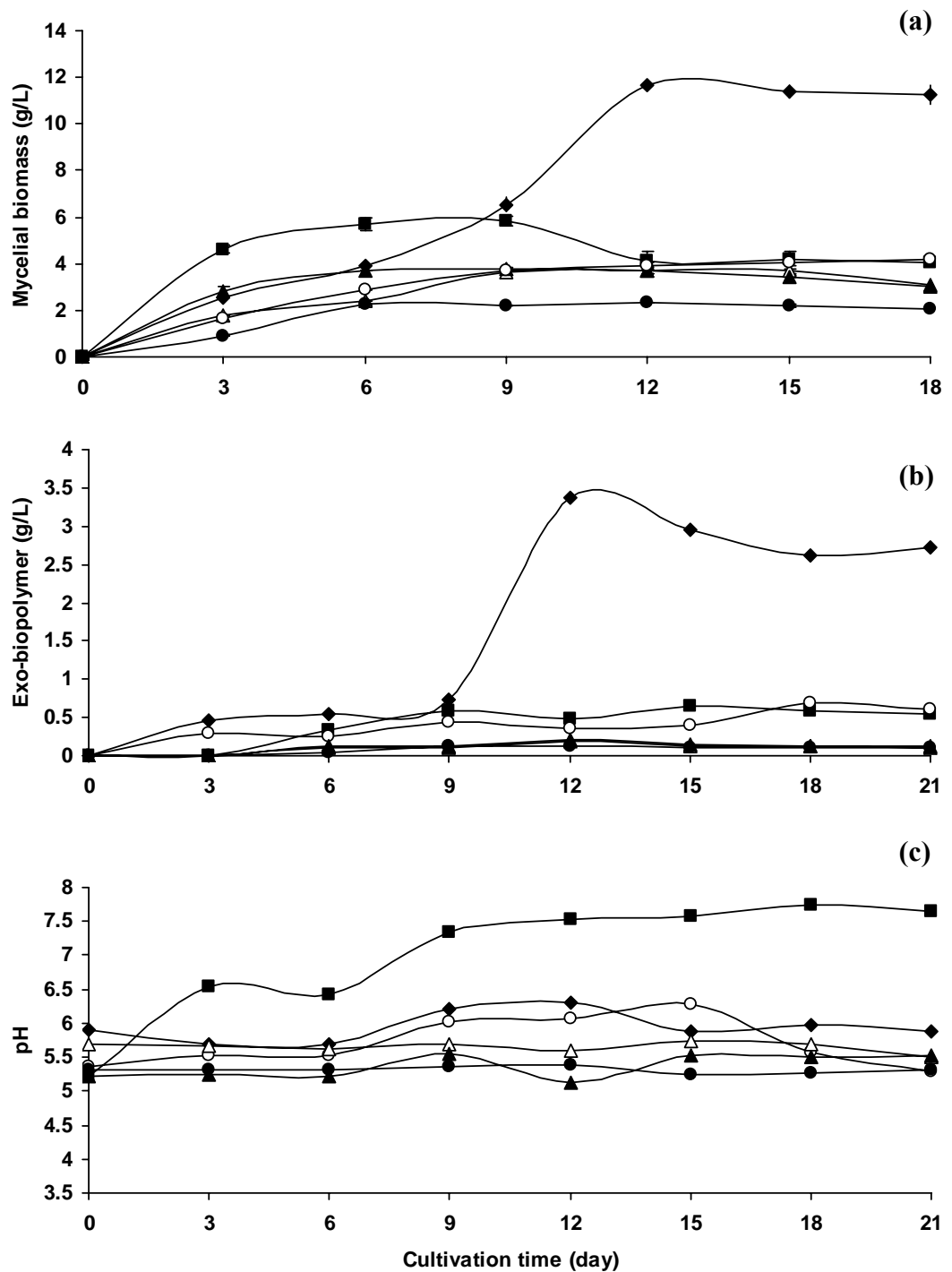


Figure 16. Time courses of mycelial growth (a), exo-biopolymer (b) and final pH (c) production by *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 in synthetic media. PDB medium (◆); YM medium (■); SDB medium (○); MCM-1 medium (Δ); MCM-2 medium (▲); SSY medium (●)

Table 13. Effect of different medium on the mycelial and biopolymer production by submerged<sup>66</sup> culture of *Cordyceps dipterrigena* BCC2073

Parameters	Media					
	PDB	YM	SDB	MCM-1	MCM-2	SSY
Maximum mycelial growth, $X_{max}$ (g/L)	11.70 ± 0.01 <sup>a</sup> (12) <sup>c</sup>	5.85 ± 0.02 (9)	4.86 ± 0.09 (18)	3.72 ± 0.12 (15)	3.78 ± 0.01 (9)	2.34 ± 0.01 (12)
Maximum exo-biopolymer, $P_{max}$ (g/L)	3.37 ± 0.34 (12)	0.64 ± 0.09 (15)	0.69 ± 0.06 (18)	0.18 ± 0.06 (12)	0.204 ± 0.12 (12)	0.16 ± 0.03 (12)
Specific growth rate, $\mu$ (1/day) <sup>b</sup>	1.30	0.203	0.239	0.147	0.162	0.158
Biopolymer productivity, (g/L/day) <sup>b</sup>	0.281	0.043	0.038	0.015	0.017	0.013
Biopolymer yield on cells (g/g)	0.288	0.109	0.142	0.048	0.054	0.068
Carbon to nitrogen ratio (C/N)	10:1	8:1	6:1	16:1	17:1	81:1

<sup>a</sup>Values are mean±S.D. of two replicates.

<sup>b</sup>Values were calculated from the slopes of data obtained from 6 to 12 day.

<sup>c</sup>Number in parenthesis indicates number of days in cultivation when the maximum mycelial growth or maximum biopolymer production was achieved.

Carbon content of the glucose was 40 % based on the chemical formula of  $C_6H_{12}O_6$ . C % equals the amount of glucose (g/l) x 40 %.

Carbon content of the sucrose was 42.07 % based on the chemical formula of  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . C % equals the amount of sucrose (g/l) x 40 %.

Carbon content of the glycerol was 39.12 % based on the chemical formula of  $C_3H_8O_3$ . C % equals the amount of glycerol (g/l) x 39.12 %.

Nitrogen content of the yeast extract was determined by the Kjeldahl method to be 12.41 %. N % equals amount of yeast extract (g/l) x 12.41 %.

Nitrogen content of the peptone was determined by the Kjeldahl method to be 12 %. N % equals amount of peptone (g/l) x 12 %.



#### 4. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 ในน้ำนึ่งปลาล์ม

##### 4.1. ลักษณะและองค์ประกอบของน้ำนึ่งปลาล์ม

ลักษณะของน้ำนึ่งโรงงานสกัดน้ำมันปลาล์มมีความแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของน้ำนึ่ง ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำนึ่งปลาล์มหรือน้ำนึ่งจากหมอนึ่งทะเลสาบปลาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปลาล์ม โดยวัดค่าพีเอช ค่าซีไอดี ปริมาณของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด ปริมาณฟีนอล ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Table 14) พบว่า น้ำนึ่งปลาล์มมีค่าพีเอชที่เป็นกรด คือ พีเอช 5.05 และมีสีน้ำตาลเข้ม ปริมาณของแข็งแขวนลอยมีค่าเป็นร้อยละ 60.22 ของปริมาณของแข็งทั้งหมด และมีปริมาณสารอินทรีย์ในรูปค่าซีไอดีทั้งหมดเท่ากับ 120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าซีไอดีที่สูงกว่าค่าที่ได้จากการรายงานของ พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552) และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533) คือ 80,000 และ 80,146 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำนึ่งปลาล์มมีปริมาณไนโตรเจน (800 มิลลิกรัมต่อลิตร) สูงกว่าน้ำนึ่งจากหมอนึ่งทะเลสาบปลาล์มจากการรายงานของ พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552) คือ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีค่าอยู่ในช่วงของการรายงานของ พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533) (22–1,287 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (8,660 มิลลิกรัมต่อลิตร) ใกล้เคียงกับรายงานของ พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552) คือ 8,550 มิลลิกรัมต่อลิตร ชนิดของน้ำตาลจากแหล่งน้ำนึ่งปลาล์มพบว่า มีน้ำตาลไซโลส อะราบีโนส ฟรุคโตส และกลูโคส สำหรับองค์ประกอบของแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ พบว่ามีแมกนีเซียม (Mg) สูงสุด (800 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ แคลเซียม (Ca) (600 มิลลิกรัมต่อลิตร), โพแทสเซียม (K) (370 มิลลิกรัมต่อลิตร), ฟอสฟอรัส (P) (200 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเหล็ก (Fe) (149.45 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ สำหรับปริมาณฟีนอล พบว่า น้ำนึ่งจากหมอนึ่งมีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 1,673.89 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสูงกว่าการรายงานของ พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552) คือ 1.85 มิลลิกรัมต่อลิตร จากข้อมูลผลการวิเคราะห์ดังกล่าว จะเห็นได้ว่าลักษณะน้ำนึ่งจากหมอนึ่งทะเลสาบปลาล์มของโรงงานสกัดน้ำมันปลาล์มในการสุ่มตัวอย่างแต่ละครั้งจะมีความแตกต่างกันในเรื่องคุณภาพของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำนึ่ง เป็นต้น

Table 14. Characteristics of sterilizer condensate from different palm oil mills

Parameters <sup>a</sup>	Sterilizer condensate		
	This study*	Noparat, 2008	Prasertsan <i>et al.</i> , 1990
Appeared color	Dark brown	Dark brown	Brown
pH	5.05	5.1	4.84 – 5.35
Total COD	120,000	80,000	45,360 – 80,146
Soluble COD	34,750	-	-
Total solid	71,900	47,696	26,367 – 76,733
Suspended solid	43,300	19,066	2,600 – 6,100
Total nitrogen	800	700	22 – 1,287
Total sugar	8,660	8,550	-
Total phenol	1,673.89	1.85	-
P	200	171.85	-
K	370	1624.25	-
Ca	600	140.25	-
Mg	800	673.00	-
Fe	149.45	82.80	-

\*Analysis from 1 sampling from a palm oil mill (Permkiat Palm Oil Co, Ltd. In southern Thailand)

<sup>a</sup>All other parameters are in mg/L except for color and pH

## 4.2 การเลี้ยงเชื้อราในน้ำนึ่งปาล์ม

### 4.2.1 การคัดเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำทิ้งในอาหารแข็งน้ำนึ่งปาล์ม

เตรียมน้ำนึ่งปาล์มที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ระดับต่างๆ โดยเจือจางน้ำนึ่งปาล์ม ซึ่งมีค่าซีโอดีเริ่มต้นที่ 120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความเจือจาง 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3 ได้น้ำนึ่งปาล์มที่มีค่าซีโอดีเป็น 120,000, 60,000, 40,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ กระตุ้นการเจริญของเชื้อเริ่มต้นโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA ที่เติมยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน ตัดชิ้นวุ้นเชื้อรา *C. dipterigena* BCC2073 ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร วางลงบนอาหารแข็งและบ่มจนเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) (Figure 17) พบว่า ในอาหารแข็งน้ำนึ่งปาล์มที่ไม่เจือจาง และที่ระดับความ

เชื้อจาก 1:0, 1:1 และ 1:2 ซึ่งมีค่าซีไอดีเท่ากับ 120,000, 60,000, และ 40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ แต่สามารถเจริญได้ในอาหารแข็งน้ำนิ่งปาล์มที่ระดับความเจือจาง 1:3 (ค่าซีไอดีเท่ากับ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหารแข็งน้ำนิ่งปาล์มมีปริมาณสารอาหารและสารยับยั้ง เช่น สารประกอบอะโรมาติก โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลซึ่งมีปริมาณสูง (1.67 กรัมต่อลิตร) จากการรายงานของ Fadil และคณะ (2003) พบการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายสาร ซึ่งเป็นผลมาจากความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลต่อจุลินทรีย์ เช่น สารประกอบอะโรมาติก ในกลุ่มโมโนฟีนอล สารประกอบฟีนอล และแทนนิน ซึ่งมักพบในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996; D'Annibale *et al.*, 1998; D'Annibale *et al.*, 1999; Crognale *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2007) โดยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายสารที่ระดับความเข้มข้นของสารประกอบอะโรมาติกสูงๆ ซึ่งอ้างอิงด้วยระดับซีไอดีในน้ำทิ้ง (Boari *et al.*, 1984 อ้างโดย D'Annibile *et al.*, 1998; Fadil *et al.*, 2003; Peixoto *et al.*, 2008) ดังนั้นในงานอาหารน้ำนิ่งปาล์มที่ไม่มีการเจือจางอาจมีความเข้มข้นของสารยับยั้ง เช่น ฟีนอลสูงเกินกว่าที่เชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 เจริญได้ อย่างไรก็ตาม เชื้อสามารถเจริญได้ในระดับความเจือจาง 1:3 (มีปริมาณซีไอดีเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร) โดยมีขนาดโคโลนีเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร โดยมีการเจริญเกิดขึ้นหลังจากวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ขนาดโคโลนีค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยง 16 วัน โดยมีขนาดโคโลนีเท่ากับ 2.6 เซนติเมตร (Table 15) เมื่อสังเกตการกำจัดสีของน้ำทิ้งในงานอาหาร พบว่า ไม่เกิดการจางสีของน้ำทิ้ง

#### 4.2.2 ผลของความเข้มข้นสารอินทรีย์ในน้ำนิ่งปาล์ม

เลี้ยงเชื้อราในน้ำนิ่งปาล์มเจือจาง ที่มีค่าซีไอดีเท่ากับ 120,000, 60,000, 40,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ระดับความเจือจาง 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3 ตามลำดับ) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตัดเส้นใยอายุ 7 วัน บนอาหาร PDA บริเวณขอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น ลงในพลาสติกที่บรรจุน้ำนิ่งปาล์มแต่ละความเข้มข้นของสารอินทรีย์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำนิ่งปาล์มต่ำที่สุดที่เชื้อราสามารถเจริญได้คือ ที่ระดับความเจือจาง 1:2 (มีค่าซีไอดีและปริมาณฟีนอลเท่ากับ 40,000 และ 556.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยเชื้อรามีการเจริญตั้งแต่วันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ มีเส้นใยเจริญรอบชิ้นอาหาร PDA และเจริญเป็นก้อนเล็กๆ กระจายทั่วน้ำทิ้ง ดังนั้น จึงเลือกน้ำนิ่งปาล์มที่มีความเข้มข้นสารอินทรีย์เท่ากับ 40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองต่อไป

ในน้ำมันปาล์มไม่เจือจางที่มีความเข้มข้นสารอินทรีย์เท่ากับ 120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (พีเอชและปริมาณฟีนอลเริ่มต้นเท่ากับ 5.05 และ 1,670 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ไม่พบการเจริญของเชื้อรา พบว่า น้ำทิ้งมีสีเข้มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ การที่น้ำทิ้งมีความเข้มสีเข้มเพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบ auto-oxidation ขององค์ประกอบในน้ำทิ้ง โดยมีลักษณะการเกิดขึ้นเหมือนกับน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกโดยมีรายงานว่า องค์ประกอบในน้ำทิ้งมีสารจำพวกกลุ่มฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติกที่มีความไม่คงตัวสูง และถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายในสถานะที่มีอากาศ เกิดเป็นสารสีซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ของฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้น้ำทิ้งมีสีดำขึ้น (D'Annibile *et al.*, 1999; Ayed and Hamdi, 2003) สำหรับการทดลองนี้ใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งมีน้ำมันในองค์ประกอบและมีการให้อากาศระหว่างการเลี้ยงเชื้อ การที่เชื้อไม่มีการเจริญอาจเกิดจากผลการยับยั้งจากสารฟีนอล ในความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง เช่นเดียวกับรายงานของ Fadil และคณะ (2003) พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกที่มีค่าซีไอดี (120 กรัมต่อลิตร) และมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล (8.2 กรัมต่อลิตร) ในน้ำทิ้งสูง มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Geotrichum sp.*, *Aspergillus sp.* และ *Candida tropicalis* และจากผลการทดลองนี้เมื่อเทียบกับผลในข้อ 4.2.1 พบว่าค่าซีไอดีที่เชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารแข็งน้ำมันปาล์มและในอาหารเหลว น้ำมันปาล์มต่างกัน โดยในอาหารเหลว น้ำมันปาล์มเชื้อราสามารถเจริญได้ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ (40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สูงกว่าในอาหารแข็งน้ำมันปาล์ม (30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งนี้เนื่องมาจากการเจริญเติบโตของราในอาหารแข็งจะแตกต่างกับการเจริญเติบโตในอาหารเหลว โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเชื้อราจะเพิ่มจำนวนโดยเส้นใยของเชื้อราจะรวมกันเป็นกลุ่มทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า pellet โดยทั่วไปเชื้อราดำรงชีพแบบ saprophyte คือ หลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนให้ได้เป็นโมเลกุลที่เล็กที่สุดแล้วจึงดูดซับเข้าไปภายในเซลล์โดยวิธี diffusion เข้าสู่ pellet สำหรับการเจริญเติบโตของราในอาหารแข็งนั้นส่วนที่ปลายเส้นใยทั้งสองด้านจะมีการเจริญเติบโตโดยีดอก แต่ทิศทางของการเจริญและอัตราการเจริญนั้นจะขึ้นอยู่กับสารอาหารและชนิดของสับสเตรท จากการที่ในอาหารแข็งน้ำมันปาล์มที่ระดับความเจือจาง 1:2 มีค่าซีไอดีและสารฟีนอลอยู่สูงจึงอาจทำให้เชื้อราไม่มีการเจริญได้ไม่คิดเมื่อเทียบกับที่ระดับเจือจาง 1:3 โดยทั่วไปพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารแข็งจะต่ำกว่าอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลวมาก โดยค่าเฉลี่ยของ Doubling time ของราจำพวกเห็ดในอาหารเหลวที่เลี้ยงในถังหมักจะมีค่าประมาณ 4-8 ชั่วโมง ขณะที่ค่า Doubling time ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง จะมีค่าประมาณ 5.5 วัน (Nielson 1996; Grimm *et al.*, 2005)

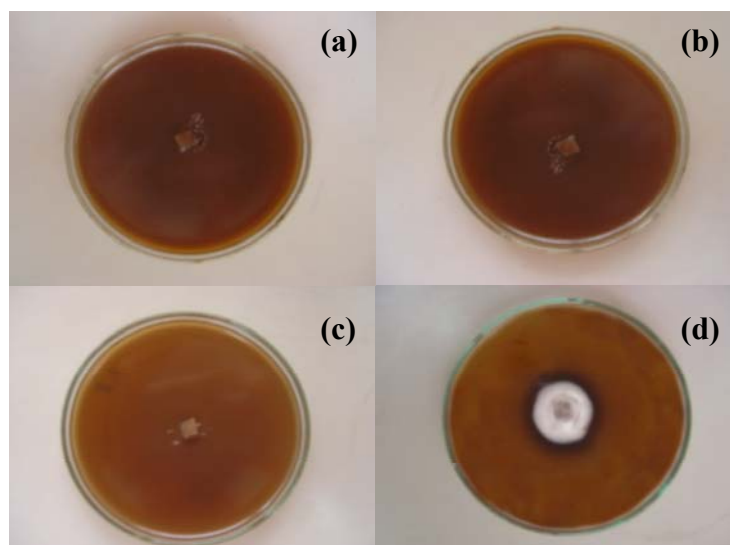


Figure 17. Comparison on growth of *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in different organic matter concentration of sterilizer condensate of palm oil mill effluent on agar plates at room temperature ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) for 16 days where (a) dilution at 1:0, (b) at 1:1, (c) at 1:2 and (d) at (1:3) and each dilution has a COD concentration equal 120, 60, 40 and 30 g/l respectively

Table 15. Effect of organic matter concentration in sterilizer condensate of palm oil mill on growth during cultivation of *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 on agar plates at  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 16 days

Ratio of sterilizer condensate:distilled water				
	1:0	1:1	1:2	1:3
Time (day)	Colony size (mm)	Colony size (mm)	Colony size (mm)	Colony size (mm)
7	-	-	-	6
9	-	-	-	8.5
10	-	-	-	10
13	-	-	-	15
14	-	-	-	20
16	-	-	-	26

(+) Positive result, (-) Negative result; Results from duplication

#### 4.2.3 การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา

เชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแล้วเกิดการบำบัดได้ดีในน้ำทิ้งที่มีค่าซีโอดีและไนโตรเจนเท่ากับ 40,000 และ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (คำนวณจากความเจือจาง 2 เท่า จากซีโอดีและไนโตรเจนเริ่มต้น 120,000 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองข้อ 4.2.2) ปรับพีเอชเริ่มต้นจาก 5.05 เท่ากับ 6.2 (ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) จาก Figure 18 พบว่า เชื้อให้ปริมาณมวลชีวภาพมากที่สุด (23.43 กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน เมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับรายงานของ Fadil และคณะ (2003) ที่เลี้ยงเชื้อ *Geotrichum* sp. และ *Aspergillus* sp. ในน้ำทิ้งที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยให้ค่าการเจริญสูงสุดโดยวัดในรูปแบบปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 16 และ 12.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าจากการทดลองนี้ สำหรับเชื้อ *Candida tropicalis* สามารถเจริญได้สูงสุดในน้ำทิ้งที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยให้ค่าปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Dias และคณะ (2004) พบว่าเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* เจริญได้น้อยในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกความเข้มข้นน้ำทิ้งร้อยละ 60 และ 80 (จากซีโอดีเริ่มต้น 130.5 กรัมต่อลิตร) และเชื้อ *Botryosphaera rhodina* DABAC-P82 สามารถเจริญและผลิต  $\beta$ -glucan ได้ดีเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกที่มีค่าซีโอดีสูง (150.5 กรัมต่อลิตร) โดยมีการเติม yeast extract และ  $\text{NaNO}_3$  เพิ่มเติม (Crognale et al., 2003) เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปอีกปรากฏว่า น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณกลูโคซามีนกลับลดลง (Table 16) ตามทฤษฎี ปริมาณกลูโคซามีนจะมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับน้ำหนักตะกอนเซลล์แห้ง ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Alexopoulos and Mims, 1979) เมื่อเชื้อรามีการเจริญดีจะมีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ปริมาณกลูโคซามีนก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้เพราะการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดด้วยสารอาหาร และสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (สมใจ สิริโชค, 2537) ดังนั้นหลังจากที่เชื้อเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วไปได้ระยะหนึ่งแล้ว อัตราการเจริญจะค่อยๆลดลง จนกระทั่งหยุดเพิ่มจำนวน และมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นจึงส่งผลให้ปริมาณกลูโคซามีนลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับกราฟของปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (Figure 18) ซึ่งพบว่ามีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 9 ของการเลี้ยงและหลังจากนั้นก็ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง แต่ในทางตรงกันข้ามน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น โดยในการทดลองได้เลี้ยงเชื้อราในน้ำทิ้งที่มีตะกอนของแข็งปนอยู่โดยเส้นใยของเชื้อราดึงเอาตะกอนของแข็งเข้าไปรวมไว้ในกลุ่มเส้นใยด้วย อีกทั้งเชื้อรามีการสร้างพอลิเมอร์ที่มีลักษณะขุ่นหนืดด้วยทำให้มีการดูดซับของแข็งเข้าไปด้วย เนื่องจากเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีการเขย่าตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง และเมื่อวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำทิ้งของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อและเลี้ยงในสภาวะเดียวกันกับ

ในน้ำทิ้งที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกัน พบว่า มีปริมาณตะกอนของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 13.56 และ 5.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือมีปริมาณลดลงเท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองของหัตถินดา บินมะแอ (2548) พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. ST29 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเจือจางที่ระดับ 1:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 52.97 เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดี พบว่า เชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในเวลา 21 วัน สามารถลดค่าซีโอดีจากค่าซีโอดีเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 25.86 กรัมต่อลิตร หรือให้ค่าประสิทธิภาพการบำบัดที่ 70.70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ พบว่า สามารถผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 6.53 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้ต่อกรัมเซลล์เท่ากับ 0.68 และค่าอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อวัน หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มขึ้นจาก 5.25 (pH ในอาหารหลังจากการฆ่าเชื้อ) เป็น 7.6 ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง หลังจากนั้นพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง 21 วัน โดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 8.27 จากค่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชนี้สามารถอธิบายได้ว่า เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราต้องการแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญ ทั้งนี้เพราะเซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยทั่วไปจุลินทรีย์พวก aerobic จะเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย ฟอสเฟต และซัลเฟต จากการที่มีแอมโมเนียเกิดขึ้น ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสูงขึ้น (สมใจ ศิริโชค, 2537) นอกจากนี้เชื้อมีการใช้สารอินทรีย์ประเภทกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดไขมัน กรดที่ระเหยได้ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) และกรดอินทรีย์สายสั้น เช่น กรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก กรดบิวทิริก (Hwang *et al.*, 1978) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้งและทำให้น้ำทิ้งมีความเป็นด่าง พีเอชจึงเพิ่มขึ้น ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อพบว่า พีเอชและความหนืดของน้ำทิ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลง

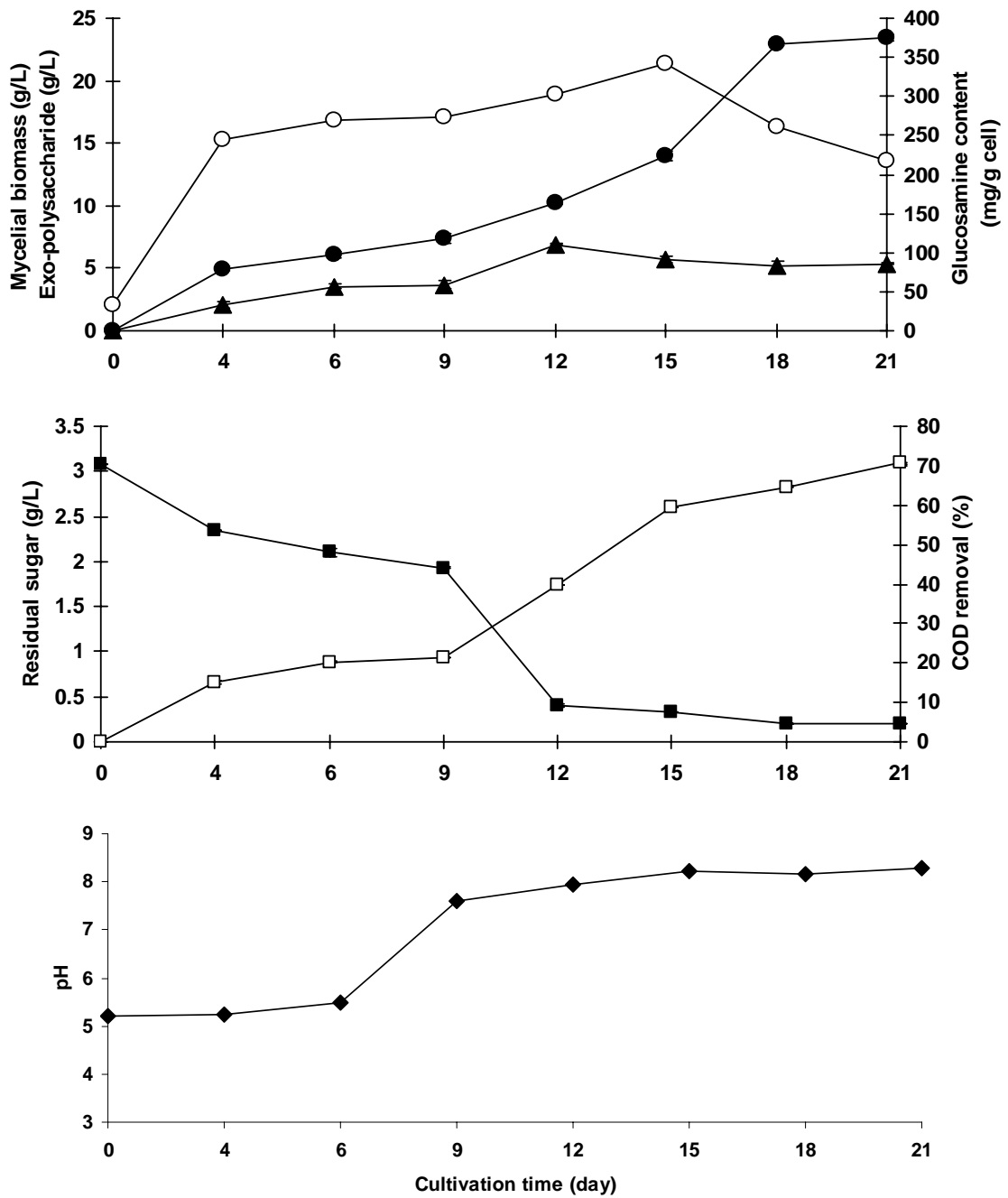


Figure 18. Time course of growth (●) and biopolymer (▲) production by *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in diluted sterilizer condensate with COD of 40 g/l, pH 6.2. Residual sugar (■), %COD removal (□), glucosamine content (○) and pH (◆). Values represented means of two independent experiments and error bars indicate standard deviations



Table 16. Glucosamine content and mycelial biomass during cultivation of *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 in diluted sterilizer condensate

Time (day)	Glucosamine content (mg/g cell/L)	Mycelial biomass (g/L)
0	0	0
4	33.997 ± 0.001	4.983 ± 0.225
6	243.997 ± 0.031	6.121 ± 0.282
9	269.997 ± 0.007	7.396 ± 0.392
12	273.997 ± 0.001	15.673 ± 0.134
15	301.997 ± 0.006	18.465 ± 0.391
18	341.997 ± 0.001	23.425 ± 0.152
21	261.997 ± 0.004	22.897 ± 0.218

#### 4.2.4 การเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าลุ่มและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

นำน้ำนิ่งป่าลุ่มที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เวลา 12 วัน มาหมวนเหวียงเพื่อกำจัดของแข็งที่ปนเปื้อน นำน้ำหมักที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 4 เท่าของของเหลว (Madla *et al.*, 2005) พอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อราจะตกตะกอนมีลักษณะเป็นฟองน้ำลอยอยู่ด้านบน ใช้แท่งแก้วคนตักพอลิเมอร์แยกออกมา แล้วนำมาละลายด้วยน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (deionized water) แล้วนำสารละลายพอลิเมอร์ไปหมวนเหวียงเพื่อแยกเอาพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำออก จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปทำไดอะไลซิส (dialysis) (MW cut off 8,000 Da) ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืด และเป็นฟองน้ำ (Figure 19a) และหลังจากทำแห้งด้วยวิธี freeze dry พบว่าพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นฟองฟู (Figure 19b) ไม่เหมือนกับพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่มซึ่งมีลักษณะร่วนเป็นผงไม่เกิดการจับตัวกันเหมือนพอลิเมอร์ที่ได้จากการตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม โดยมีน้ำหนักของพอลิเมอร์หลังการตกตะกอนเท่ากับ 7.31 กรัมต่อลิตร และหลังจากผ่านการทำแห้งได้พอลิเมอร์เท่ากับ 2.56 กรัมต่อลิตร

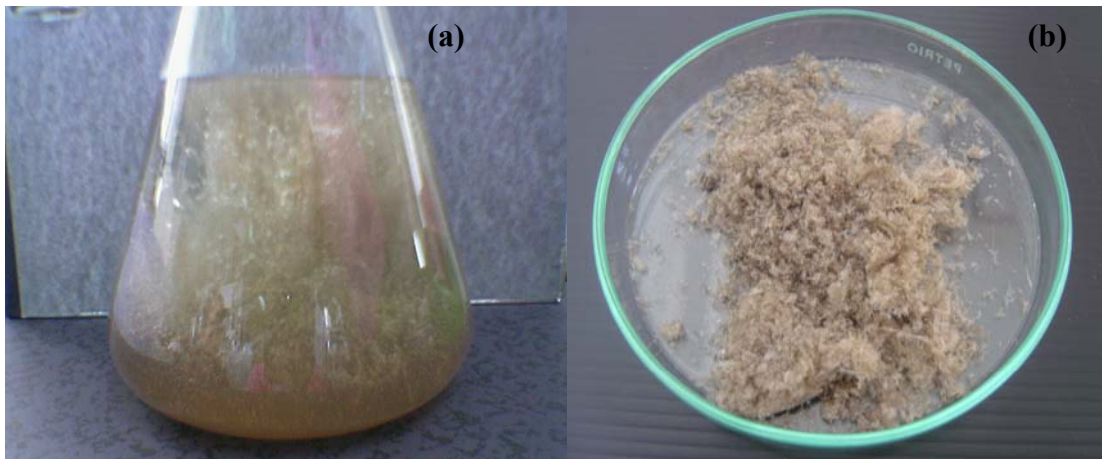


Figure 19. The fibrous characteristics of polymer from *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in diluted sterilizer condensate after precipitation with 95% ethanol (a) and after freeze drying (b)

## 5. ศึกษาลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนึ่งปลาล์มและจากเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปลาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

### 5.1 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์ชีวภาพ

การทดสอบการละลายของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนึ่งปลาล์มขนาดโมเลกุลเล็ก (SC-S) และโมเลกุลใหญ่ (SC-L) และจากเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปลาล์มในตัวทำละลาย 10 ชนิด ดังนี้ น้ำกลั่น ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) อะซิโตรไนไตรล์ เมทานอล อะซิโตน โพรพานอล ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ และเฮกเซน โดยเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ไม่มีการเติมพอลิเมอร์ชีวภาพ (Table 17) พบว่า พอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนึ่งปลาล์มทั้งสองชนิดและจากเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 สามารถละลายได้ดีในน้ำและ DMSO แต่ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่า DMSO ซึ่งในตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีสภาพขั้วต่างกัน โดยตัวทำละลายที่มีขั้วจะสามารถละลายสารประกอบไอออนิกและสารประกอบโควาเลนต์ที่มีขั้วได้ น้ำเป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้วโดยมีพันธะไฮโดรเจนจับกันด้วยแรงไดโพล-ไดโพล และเป็นโมเลกุลที่มีไดโพลที่เสถียรมากโดยมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอีก 9 ชนิด สำหรับตัวถูกละลาย (พอลิเมอร์ชีวภาพ) เป็นสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยคาร์บอนโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ และจากผลการวิเคราะห์ FT-IR มีหมู่เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจับกันด้วยแรงไดโพล-ไดโพลเช่นเดียวกันจึงเกิดการละลายในพวกมีขั้วด้วยตัวเอง สำหรับการละลายในไดเมทิลซัลโฟไซด์พบว่าพอลิเมอร์

ชีวภาพจากน้ำนิ่งป่าดงทั้งสองชนิดสามารถละลายได้ดี แต่พอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรานี้ละลายได้บางส่วน โดยสามารถละลายได้สูงสุด 47 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงลักษณะการละลายของพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งสามชนิด พบว่าพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าดงสามารถละลายน้ำได้เร็วกว่าพอลิเมอร์จากเชื้อรา โดยไม่ปรากฏลักษณะการฟองตัวของพอลิเมอร์ แต่สำหรับพอลิเมอร์จากเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 พอลิเมอร์จะเกิดการฟองตัว มีลักษณะคล้ายวุ้น ซึ่งเป็นลักษณะการละลายของพอลิเมอร์ที่เป็น โข่ยยาวหรือมีขนาดใหญ่ กระบวนการเกิดสารละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายโดยทั่วไปจึงเกิดได้ช้ากว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการละลายของสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กหรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2527) ความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ในตัวทำละลายต่างกัน มีประโยชน์ในงานอื่น เช่น การสกัดแยก / ตกตะกอนพอลิเมอร์ การทำให้พอลิเมอร์บริสุทธิ์ และการสังเคราะห์อนุพันธ์ทางเคมีของพอลิเมอร์ เป็นต้น

Table 17. Solubility of biopolymers from sterilizer condensate (SC-S, SC-L) and *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultured in sterilizer condensate

Solvents	Dipole moment	Dielectric constant	Solubility		
			SC-S	SC-L	<i>Cordyceps dipterrigena</i> BCC207
Distilled water	1.85	80	++	++	++
DMSO	3.96	47.2	++	++	+
Acetonitrile	3.92	36.6	-	-	-
Methanol	1.7	33	-	-	-
Acetone	2.88	20.7	-	-	-
Propanol	1.68	20.1	-	-	-
Dichloromethane	1.14	8.93	-	-	-
Chloroform	1.08	4.81	-	-	-
Diethyl ether	1.15	4.34	-	-	-
Hexane	-	2.02	-	-	-

Remarks: ++ completely + partly - insoluble

## 5.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์

เมื่อวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งป่าลัม และจากเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าลัมเป็นเวลา 6 วัน ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่า แถบที่ปรากฏในย่านความถี่  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  ของทั้ง 3 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) อีเทอร์ (C-O-C) กลุ่มคาร์บอนิล ได้แก่ เอสเทอร์ (O-C=O), แอลดีไฮด์ (C=O), คาร์บอกซิล (HO-C=O) และแอลเคน (-CH) โดยแถบที่ปรากฏมีลักษณะดังนี้ ในพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลัม ขนาดโมเลกุลเล็ก (SC-S) พบแถบสเปกตรัมที่เป็นตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิล ในช่วงความถี่  $3415.98$  และ  $1626.71\text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ มีแถบเอสเทอร์อยู่ในช่วงความถี่  $1103.29$  และ  $1077.33\text{ cm}^{-1}$  แถบอีเทอร์อยู่ในช่วงความถี่  $1019.81-1050.06\text{ cm}^{-1}$  แถบแอลดีไฮด์พบในช่วงความถี่  $1746.57\text{ cm}^{-1}$  สำหรับแถบที่เกิดในช่วงความถี่  $2929.95$  และ  $1265.24\text{ cm}^{-1}$  เป็นแถบที่เกิดจากการยืดของพันธะ C-H โดยอยู่ในกลุ่มของ methylene ( $\text{CH}_2$ ) และ methyl ( $\text{CH}_3$ ) ตามลำดับ และเกิดแถบจากการงอของพันธะ C-H ในช่วงความถี่  $1419.73$  และแสดงแถบของ C-H ในสารประกอบอะโรมาติก (ในช่วงความถี่  $764.24\text{ cm}^{-1}$ ) (Figure 20a) และแถบสเปกตรัมในพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลัมขนาดโมเลกุลใหญ่ (SC-L) มีลักษณะคล้ายกับพอลิเมอร์ SC-S คือ พบแถบสเปกตรัมที่เป็นตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลในช่วงความถี่  $3407.22$  และ  $1625.72\text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ แถบเอสเทอร์อยู่ในช่วงความถี่  $1101.75$  และ  $1145.70\text{ cm}^{-1}$  พบแถบอีเทอร์ในช่วงความถี่  $1022.45-1049.16\text{ cm}^{-1}$  แถบแอลดีไฮด์พบในช่วงความถี่  $1743.34\text{ cm}^{-1}$  และพบแอลเคนในช่วงความถี่  $2936.50$  และ  $1373.72\text{ cm}^{-1}$  โดยอยู่ในกลุ่มของ methylene ( $\text{CH}_2$ ) และ methyl ( $\text{CH}_3$ ) ตามลำดับ และเกิดแถบของพันธะ C-H ในวงแหวนอะโรมาติก (ในช่วงความถี่  $763.80\text{ cm}^{-1}$ ) และเกิดแถบจากการงอของพันธะ C-H ในช่วงความถี่  $1419.73\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งมีลักษณะเดียวกันกับในพอลิเมอร์ SC-S นอกจากนี้ยังพบแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการยืดของพันธะ  $\text{C}_1\text{-H}$  ( $\beta$ -glycosidic linkage) ในช่วงความถี่  $895.20\text{ cm}^{-1}$  อีกด้วย (Figure 20b) สำหรับพอลิเมอร์จากเชื้อรา พบแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการยืดของพันธะ  $\text{C}_1\text{-H}$  ( $\beta$ -glycosidic linkage) เช่นเดียวกันกับพอลิเมอร์ SC-L (ในช่วงความถี่  $892.49\text{ cm}^{-1}$ ) และแถบสเปกตรัมที่เป็นตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลช่วงความถี่  $3403.01\text{ cm}^{-1}$  คาร์บอกซิลในช่วงความถี่  $1637.54\text{ cm}^{-1}$  และเอสเทอร์ช่วงความถี่  $1077.33$  และ  $1147.63\text{ cm}^{-1}$  นอกจากนี้ยังพบแถบที่เกิดจากการยืดตัว (ในช่วงความถี่  $2932.46\text{ cm}^{-1}$ ) ของพันธะ C-H และเกิดแถบจากการงอของพันธะ C-H (ในช่วงความถี่  $1421.65\text{ cm}^{-1}$ ) เช่นเดียวกันกับพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลัมทั้งสองชนิด (Figure 20c) ดังนั้นจะเห็นว่า พอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากมีหมู่แอลดีไฮด์ (C=O) ไฮดรอกซิล (OH) เป็นองค์ประกอบของน้ำตาล

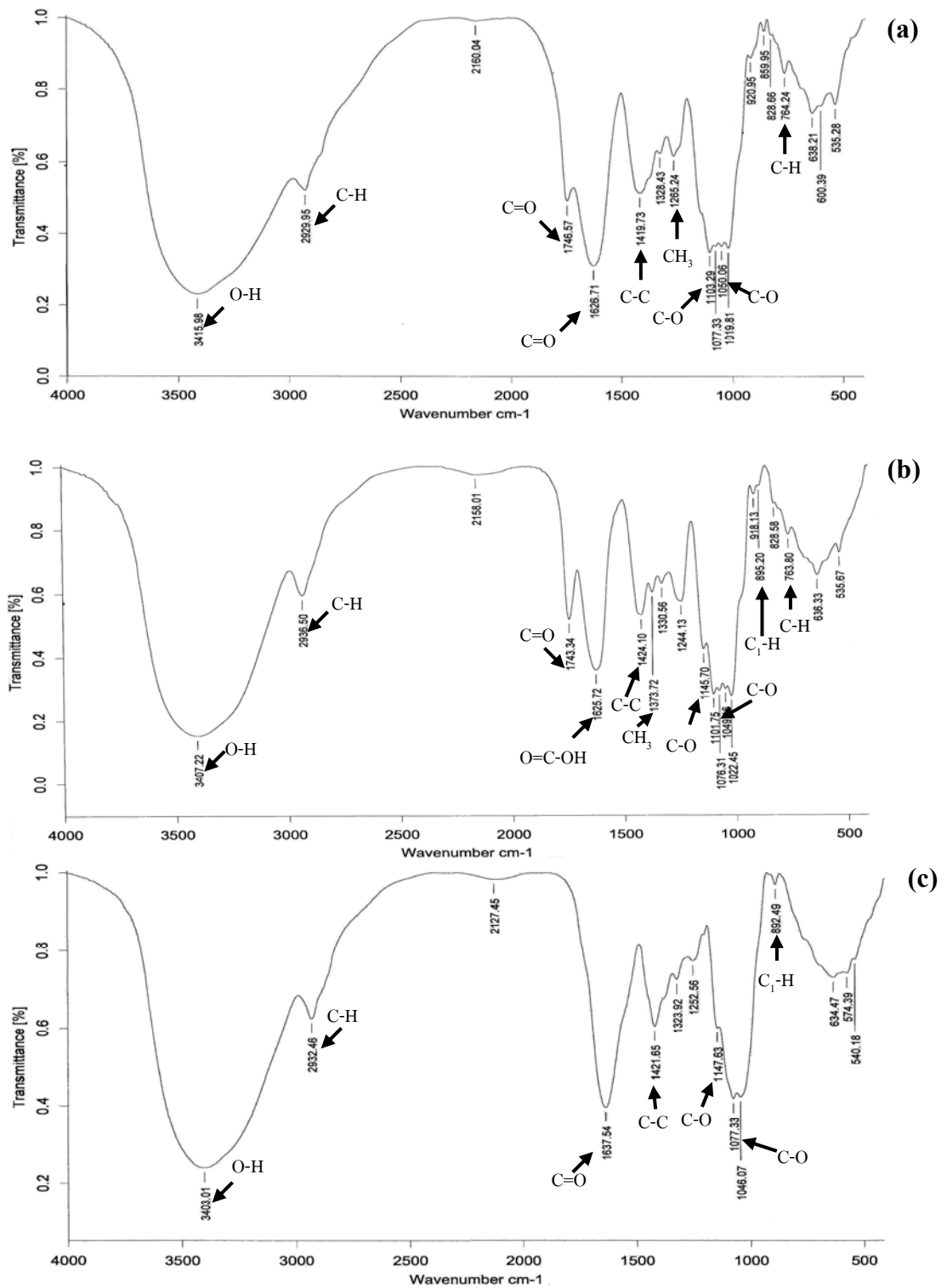


Figure 20. The infrared spectra of the partially purified biopolymer from sterilizer condensate of palm oil mill; small molecule (SC-S) (a), and large molecule (SC-L) (b), and *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (c)

ผลที่ได้สอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชันของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากฟางข้าวสาลี ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล ( $3414\text{ cm}^{-1}$ ) คาร์บอกซิล ( $1610\text{ cm}^{-1}$ ) และแถบการยืดตัว ( $2919\text{ cm}^{-1}$ ) และงอตัว ( $1413\text{ cm}^{-1}$ ) ของพันธะ C-H นอกจากนี้ยังปรากฏแถบในช่วงความถี่ของ  $1164\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึงสายพอลิเมอร์มีอะราบินโนสเป็นกิ่งก้าน และเกิดแถบของพันธะ glycosidic ใน C-O-C ช่วงความถี่  $1039\text{ cm}^{-1}$  (Ren *et al.*, 2008) และจากแถบสเปกตรัมของหมู่คาร์บอกซิลและหมู่เอสเตอร์แสดงว่าพอลิเมอร์อาจมี uronic acid และ ferulic acid เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้พอลิเมอร์ชนิด SC-L และ พอลิเมอร์จากเชื้อรา มีลักษณะคล้ายกันกับพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดกลูแคนที่เคยมีรายงานมา โดยแสดงแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการยืดของพันธะ C<sub>1</sub>-H ( $\beta$ -glycosidic linkage), หมู่ไฮดรอกซิล, คาร์บอนิล และอีเทอร์ (Huang *et al.*, 2004) โดย frequency ของสารกลุ่มต่างๆ ที่อยู่ในพอลิเมอร์เหล่านี้สรุปอยู่ใน Table 18

Table 18. The dominant spectrum and wave number of partially purified biopolymers from sterilizer condensate SC-S, SC-L and *C. dipterrigena* BCC2073 analysed by FT-IR spectroscopy

	Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Characteristic group
SC-S	3415.98	O-H stretching (alcohol)
	2929.95	C-H stretching (methylene)
	1746.57	C=O (aldehyde)
	1626.71	C=O asymmetric and symmetric
	1419.73	stretching (carboxylic acid)
	1265.24	C-H (methyl)
	1103.29 and 1077.30	C-O stretching (ester) and C-C
	1019.81-1050.06	C-O (ether)
	764.24	C-H bending

Table 8 (Continued)

	Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Characteristic group
SC-L	3407.22	O-H stretching (alcohol)
	2936.50	C-H stretching (methylene)
	1743.34	C=O (aldehyde)
	1625.72	C=O asymmetric and symmetric stretching (carboxylic acid)
	1424.10	CH <sub>2</sub> deformation/C-C (aromatic C=C)
	1373.72	C-H (methyl)
	1145.70 and 1101.75	C-O stretching (ester) and C-C
	1022.45-1049.16	C-O (ether)
	895.20	C <sub>1</sub> -H (β-glycosidic linkage)
763.80	C-H bending	
<i>C. dipterrigena</i> BCC2073	3403.01	O-H stretching (alcohol)
	2932.46	C-H stretching (methylene)
	1637.54	C=O asymmetric and symmetric stretching (carboxylic acid)
	1421.65	CH <sub>2</sub> deformation/C-C (aromatic C=C)
	1147.63 and 1077.33	C-O stretching (ester) and C-C
	1046.07	C-O (ether)
	892.49	C <sub>1</sub> -H (β-glycosidic linkage)C <sub>1</sub> -H (β-glycosidic linkage)

### 5.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC)

น้ำหนักโมเลกุลเป็นสมบัติที่สำคัญมากอย่างหนึ่งของพอลิเมอร์ ซึ่งต้องนำมาพิจารณาในการสังเคราะห์และการนำไปประยุกต์ใช้ เนื่องจากสมบัติบางอย่างของพอลิเมอร์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุล เช่น ความแข็งแรงเชิงกล (mechanical strength) (เต็มสุข แดงหอม และคณะ, 2004) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างพอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนึ่งป่าลัมและจากการเลี้ยงเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ในน้ำนึ่งป่าลัม (Table 19) เปรียบเทียบกับ

สารมาตรฐานพอลิกลูแลนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่ตำแหน่งสูงสุดของพีค (Mp) พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม พีคที่ได้มีลักษณะเป็นแถบกว้าง (broad) แสดงถึงการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล จากการวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี GPC (Table 19) พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ชีวภาพจาก SC-S, SC-L และเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์มมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1233, 26861 และ 38249 ดาลตัน ตามลำดับ สารเหล่านี้จึงจัดเป็นพอลิเมอร์เนื่องจากลักษณะของพอลิเมอร์เกิดจากโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์มาเรียงต่อกัน โดยมีค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดที่จัดเป็นพอลิเมอร์คือ หลักพัน (O'dian, 1993) สำหรับค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 1.441, 3.605 และ 1.674 ตามลำดับ

Table 19. Molecular weight and polydispersity of biopolymers from sterilizer condensate SC-S, SC-L and *C. dipterrigena* BCC2073

Biopolymers from	Mn (Da)	Mw (Da)	Mp (Da)	Polydispersity (Mw/Mn)
SC-S	856	1,233	1,223	1.441
SC-L	7,451	26,861	6,431	3.605
<i>C. dipterrigena</i> BCC2073	22,853	38,249	20,064	1.674

#### 5.4 องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพ

เมื่อศึกษาลักษณะทางเคมีของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากน้ำนิ่งปาล์ม SC-S, SC-L และเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์ม (Table 20) พบว่า พอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มชนิด SC-S และ SC-L ประกอบด้วยน้ำตาลกลุ่มเฮกโซส (คาร์บอน 6 อะตอม) ปริมาณ 62.00 และ 86.61 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ และมีน้ำตาลกลุ่มเพนโทส (คาร์บอน 5 อะตอม) ปริมาณ 55.31 และ 77.26 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณ 101.78 และ 100.22 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 42.18 และ 43.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำตาลทั้งหมด สำหรับเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ประกอบด้วยน้ำตาลกลุ่มเฮกโซส (คาร์บอน 6 อะตอม) เท่ากับ 62.61 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ และมีน้ำตาลกลุ่มเพนโทส (คาร์บอน 5 อะตอม) เท่ากับ 56.78 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณ 66.89 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ หรือคิดเป็น 32.58 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูคูโรนิกในพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม SC-S, SC-L และเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 พบว่า มีปริมาณเท่ากับ 3.70, 17.86 และ 14.18 มิลลิกรัมต่อลิตร



ตามลำดับ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งสามชนิดประกอบด้วยส่วนของโมเลกุลน้ำตาลชนิด 5 และ 6 คาร์บอน และมีกรดกลูคูโรนิกประกอบอยู่ในโครงสร้างอีกด้วย สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของ FT-IR ของพอลิเมอร์ชีวภาพที่แสดงหมู่ไฮดรอกซิลและคาร์บอนิล

Table 20. Carbohydrates components of the partially purified biopolymers

Method	Analyzed Item	SC-S	SC-L	<i>C. dipterrigena</i> BCC2073
Phenol sulfuric acid reaction	Total sugar (mg/g)	241.29	231.70	205.33
L-cysteine hydrochloride assay	- Hexose content	62.00	86.61	62.61
Ferric-orcinol assay	- Pentose content	55.31	77.26	56.78
DNS	Reducing sugar (mg/g)	101.78	100.22	66.89
Anthrone reaction	Neutral sugar (mg/g)	124.04	149.97	164.12
Carbazole-sulphuric reaction	Glucuronic acid (mg/g)	3.70	17.86	14.18

## 5.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์

### 5.5.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งป่าดัม (SC-S และ SC-L) และจากเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าดัม ที่ผ่านการย่อยด้วย 3 M Trifluoroacetic acid เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย isopropyl alcohol : ethyl acetate : H<sub>2</sub>O ในอัตราส่วน 3:3:1 (Figure 21) พบว่า พอลิเมอร์ SC-S ที่ผ่านการย่อยปรากฏ 5 แถบ โดยมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.071, 0.142, 0.506, 0.625 และ 0.702 (lane a) พอลิเมอร์ SC-L ปรากฏ 6 แถบ โดยมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.071, 0.149, 0.458, 0.530, 0.631 และ 0.702 (lane b) และพอลิเมอร์จาก *C. dipterrigena* BCC2073 ปรากฏ 6 แถบ โดยมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.083, 0.155, 0.464, 0.530, 0.631 และ 0.702 (lane c) ผลการทดลองของตัวอย่างที่ได้เมื่อเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานแรมโนส (lane d) ไชโลส (lane e) ฟรุคโตส (lane f) อะราบิโนส (lane g) กลูโคส (lane h) กาแลคโตส (lane i) และแมนโนส (lane j) ซึ่งมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.708, 0.625, 0.512, 0.536, 0.506, 0.458 และ 0.554 ตามลำดับ พบว่า พอลิเมอร์จากเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 มีค่า R<sub>f</sub> ใกล้เคียงกับน้ำตาลกาแลคโตส อะราบิโนส ไชโลส และแรม

โนส จึงคาดว่าน่าจะมีน้ำตาลกาแลคโตส อะราบิโนส ไซโลส และแรมโนส เป็นองค์ประกอบ สำหรับพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม SC-S มีค่า Rf ใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และแรมโนส และพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์ม SC-L มีค่า Rf ใกล้เคียงกับน้ำตาลกาแลคโตส อะราบิโนส ไซโลส และแรมโนส เป็นองค์ประกอบ จึงน่าจะมีน้ำตาลเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ในพอลิเมอร์ ทั้งสามชนิดยังปรากฏแถบที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกันอีกสองแถบ คือที่ค่า Rf เท่ากับ 0.071 และ 0.149 แต่จากผลการวิเคราะห์นี้จะเห็นได้ว่าค่า Rf ของน้ำตาลมาตรฐานหลายชนิดมีค่าใกล้เคียงกันและ ใกล้เคียงกับค่า Rf ของน้ำตาลในพอลิเมอร์ ดังนั้นเพื่อความแน่ชัดจึงทำการยืนยันผลการทดลองด้วย เทคนิควิเคราะห์ HPLC

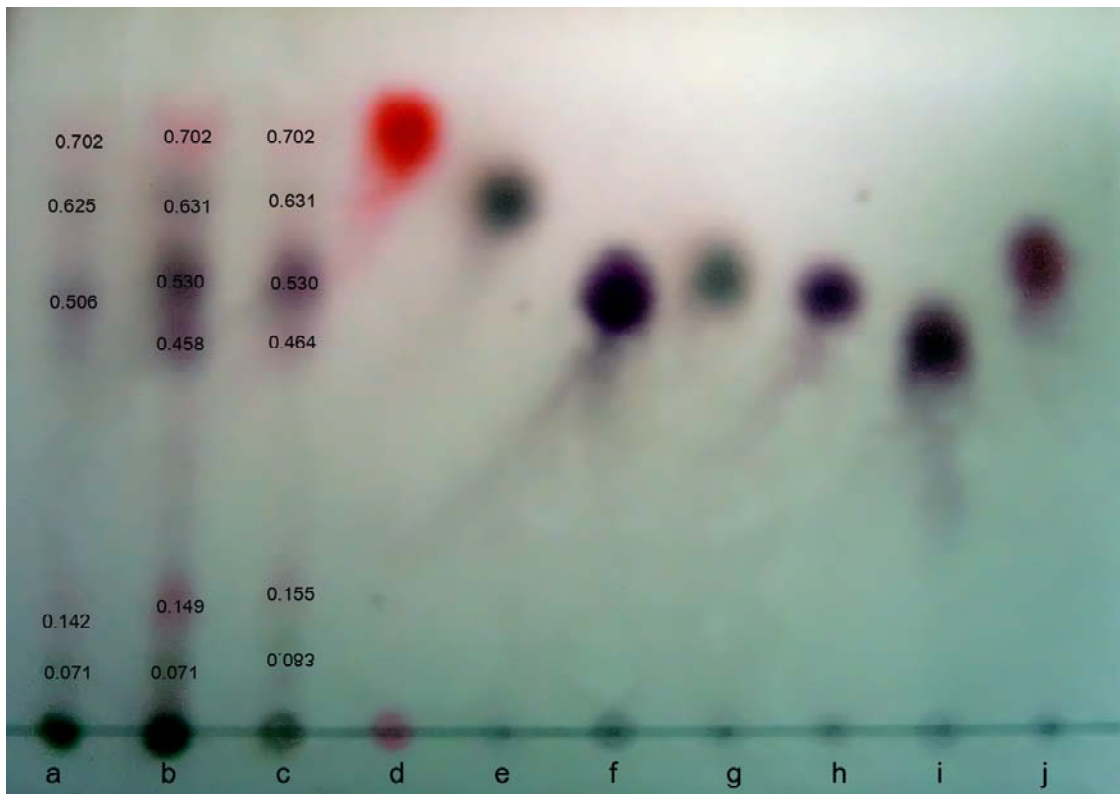


Figure 21. TLC identification of sugar composition in the biopolymer from sterilizer condensate of palm oil mill SC-S (a), SC-L (b) and biopolymer produced by *Cordyceps dipterigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate of palm oil mill (c) hydrolyzed with 3 N TFA using Rhamnose (d), Xylose (e), Fructose (f), Arabinose (g), Glucose (h), Galactose (i) and Mannose (j) as a reference sugars

## 5.5.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในพอลิเมอร์ ผ่านการย่อยด้วย 2 M Trifluoroacetic acid เป็นเวลา 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี HPLC โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน คือ ไรโบส กลูโคส โซโลส และอะราบิโนส ใช้ Aminex HPX-87H column ทำการชะด้วย 0.05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ด้วยอัตราเร็ว 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสารมาตรฐานน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด คือ ไรโบส กลูโคส โซโลส และอะราบิโนส ถูกแยกออกมาที่เวลา 12.465, 17.975, 19.278 และ 21.097 นาที ตามลำดับ (Figure 22) สำหรับพอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนิ่งป่าล้มชนิด SC-S ปรากฏ peak ตรงกับน้ำตาลกลูโคส โซโลส และอะราบิโนส ที่เวลา 17.968, 19.294 และ 21.097 นาที ตามลำดับ โดยมีปริมาณเท่ากับ 41.29, 109.29 และ 26.14 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ (Figure 23a) และพอลิเมอร์ SC-L ตรงกับน้ำตาลกลูโคส โซโลส และอะราบิโนส ที่เวลา 17.938, 19.199 และ 21.084 นาที ตามลำดับ มีปริมาณเท่ากับ 5.86, 43.64 และ 7.75 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ (Figure 23b) ตามลำดับ ส่วนพอลิเมอร์จากเชื้อรา *C. dipterigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าล้ม ปรากฏ peak ดังแสดงใน Figure 23c เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเวลาในการใช้แยกสารมาตรฐานน้ำตาล พบว่าตรงกับน้ำตาลกลูโคส และอะราบิโนส ที่เวลา 18.376 และ 21.245 นาที ตามลำดับ โดยมีปริมาณเท่ากับ 147.41 และ 120.68 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ (Figure 22, 23) มีค่าระยะเวลาในการแยกแตกต่างกัน เนื่องจากการวิเคราะห์ HPLC คนละครั้งกัน สภาวะบางอย่างอาจมีการเปลี่ยนแปลงไป แต่ระยะเวลาที่ออกมาของสารก็จะเทียบกับระยะเวลาของน้ำตาลมาตรฐานของครั้งที่วิเคราะห์ซึ่งตรงกัน จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปและจำแนกชนิดพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าล้ม SC-S และ SC-L ได้เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลโซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งอาจได้แก่ เฮมิเซลลูโลสจำพวก กลูโคโรโนโซแลน (glucuronoxylan) หรือ อะราบิโนโซแลน (arbinoxylan) (Complex carbohydrate research center, 2007) ส่วนพอลิเมอร์จากเชื้อรา *C. dipterigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าล้ม สามารถจำแนกพอลิเมอร์ได้เป็นเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ (Zhang *et al.*, 2006) เนื่องจากมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และอะราบิโนส เป็นองค์ประกอบ ซึ่งต่างจากผลการศึกษาที่ผ่านมา โดยพบว่าพอลิแซคคาไรด์จาก *Cordyceps dipterigena*, *Cordyceps nipponica* (Madla *et al.*, 2005) และ *Cordyceps militaris* (Yu *et al.*, 2004) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว อย่างไรก็ตาม Kim และ Yun (2005) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในพอลิแซคคาไรด์จาก *Cordyceps sinensis* พบว่า ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (7.75 %) แมนโนส

(42.19 %) กาแลคโตส (43.37 %) และอะราบิโนส (4.61 %) เป็นองค์ประกอบ จึงจัดเป็นกาแลคโตแมนแนน

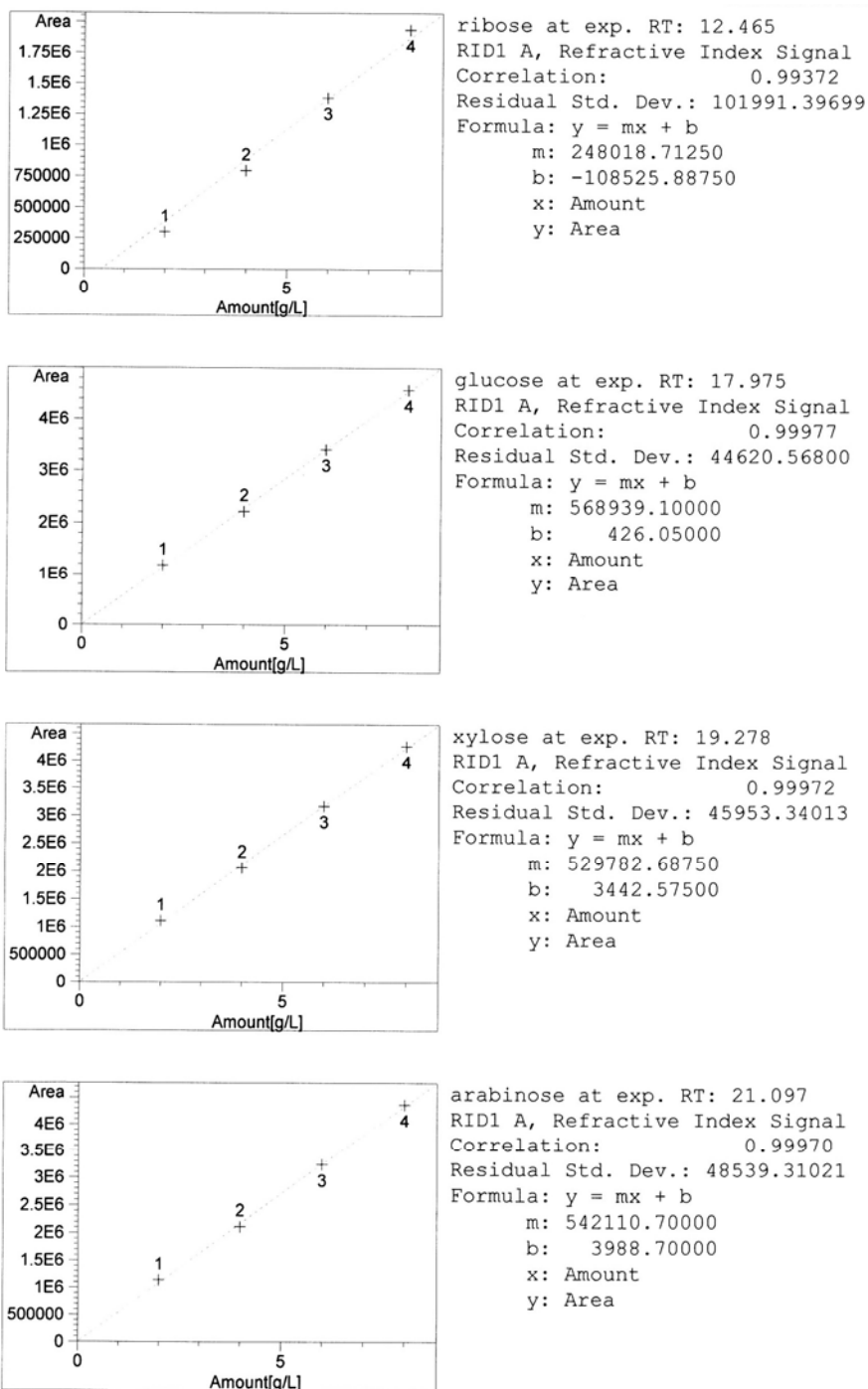


Figure 22. Calibration curves of sugars by HPLC analysis

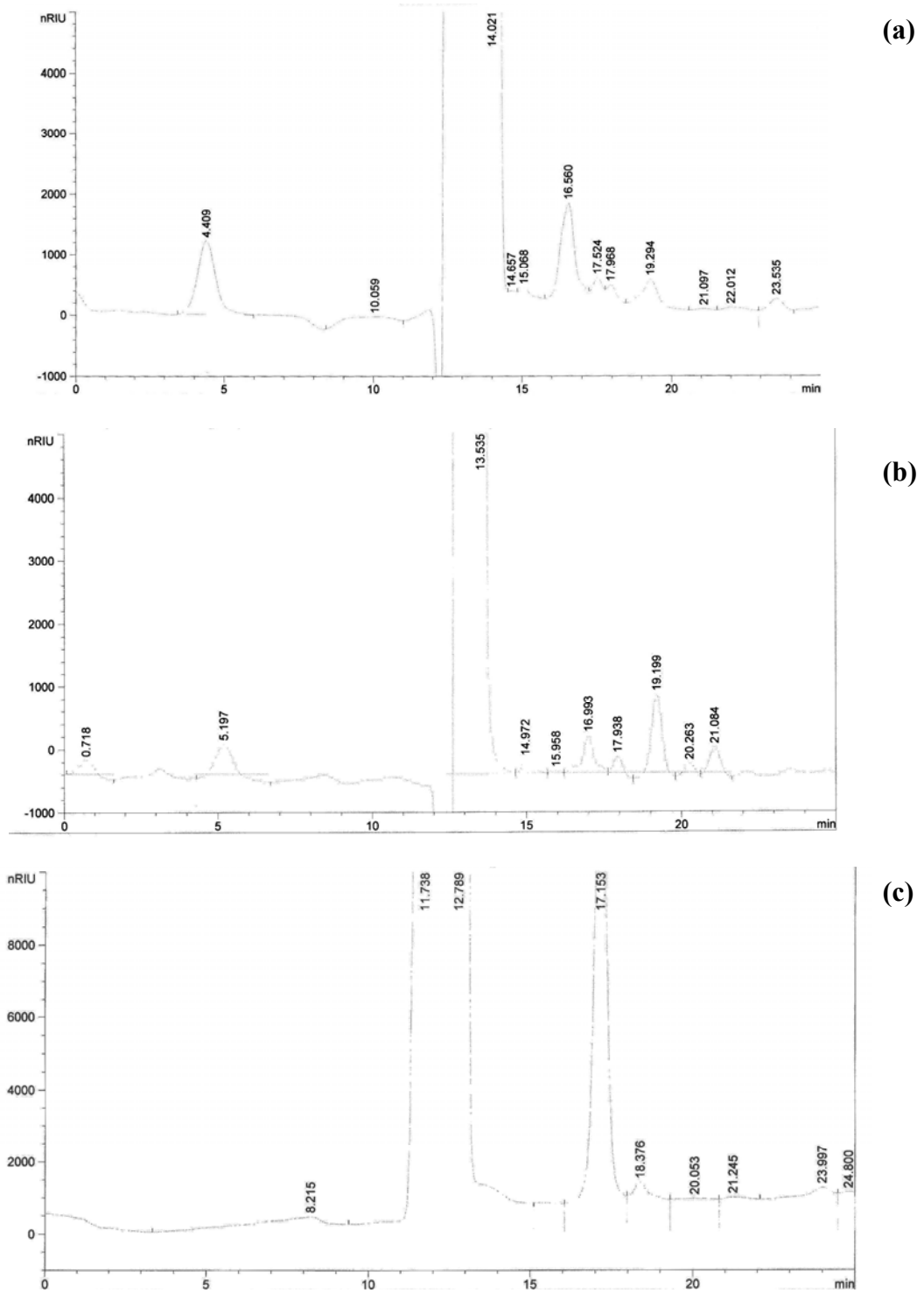


Figure 23. HPLC chromatograms of hydrolysate of biopolymer from sterilizer condensate of palm oil mill (SC-S) (a), and (SC-L) (b), and hydrolysate of biopolymer from *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (c)

## 6. คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

### 6.1 การเตรียมสารพอลิเมอร์

นำสารพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด คือ พอลิเมอร์ที่สกัดด้วยเอทานอลจากน้ำนิ่งปาล์มมี SC-S และ SC-L และพอลิเมอร์จากเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์ม มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า สารพอลิเมอร์ที่ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดคือ พอลิเมอร์ SC-S (505.851 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์) รองลงมาคือ พอลิเมอร์ SC-L (433.033 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์) ส่วนพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 258.101 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 24. และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คิดเป็น 10.255, 11.488 และ 20.373 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดซึ่งพบในพอลิเมอร์จาก SC-S, SC-L และ *C. dipterrigena* BCC2073 ตามลำดับ

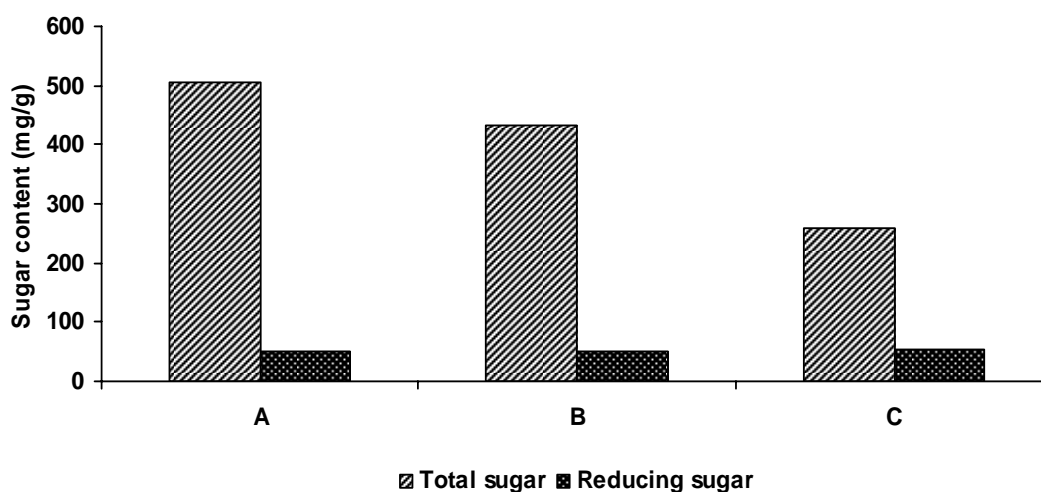


Figure 24. Total sugar and reducing sugar of biopolymers from sterilizer condensate of palm oil mill; SC-S (A), SC-L (B) and *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (C)

## 6.2 ผลของการทนต่อการย่อยในสถานะที่เป็นกรด

ในการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อการย่อยในสถานะที่เป็นกรดของสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่สกัดด้วยเอทานอลจากน้ำนิ่งปาล์ม SC-S และ SC-L และจากเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์ม เพื่อคัดเลือกพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีศักยภาพที่จะไม่ถูกย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหาร ซึ่งกระเพาะอาหารของคนปกติจะมีพีเอช 1-3 เมื่อย่อยสารพอลิเมอร์ทั้งหมดที่มีพีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงพบว่า ในสถานะความเป็นกรดที่พีเอช 1 พอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนิ่งปาล์มส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็ก (SC-S) ถูกย่อยสลายสูงสุดโดยเมื่อครบเวลา 4 ชั่วโมง คือถูกย่อย  $2.81 \pm 0.03$  เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณพอลิเมอร์เริ่มต้น รวมทั้งเป็นพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสูงสุดที่พีเอช 2 และ 3 ด้วย โดยมีแนวโน้มในการถูกย่อยเพิ่มขึ้นในหนึ่งชั่วโมงแรก และคงที่จนถึง 4 ชั่วโมง ในขณะที่พอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนิ่งปาล์มส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ (SC-L) ทนต่อสถานะความเป็นกรดได้ดีที่สุดโดยถูกย่อยที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง เท่ากับ  $2.20 \pm 0.04$  เปอร์เซ็นต์ ส่วนพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์มนั้นถูกย่อย  $2.54 \pm 0.05$  เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง (Figure 25) ดังนั้น พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดสามารถทนต่อการย่อยโดยกรดที่พีเอช 1 ได้สูงโดยมีส่วนที่ไม่ถูกย่อยถึง 97.8, 97.19 และ 97.46 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนิ่งปาล์มในส่วนของน้ำหนักโมเลกุลใหญ่และน้ำหนักโมเลกุลเล็ก และพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงน้ำนิ่งปาล์ม ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยของพอลิเมอร์เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่มีการทดสอบมาแล้ว พบว่า สามารถทนการถูกย่อยในสถานะที่เป็นกรดสูงเช่นเดียวกับพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella cibaria* A2, *Lactobacillus plantarum* A3, *Weissella confusa* A9 และ *Pediococcus pentosaceus* 5S4 โดยถูกย่อยไปร้อยละ 0.35, 1.59, 2.5 และ 0.55 ของปริมาณพอลิเมอร์เริ่มต้น ตามลำดับ (นันทิภา เจริญทอง, 2550) เช่นเดียวกับรายงานของ นิรัญญา บุญรัตน์ (2550) โดยศึกษาการทนต่อการย่อยในสถานะที่เป็นกรดของสารสกัดจากมันเทศสีขาวเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง พบว่ามีปริมาณองค์ประกอบของสารสกัดที่ไม่ถูกย่อยเหลืออยู่ 75.37, 84.25, 74.29 และ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากถูกย่อยเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่พีเอช 1

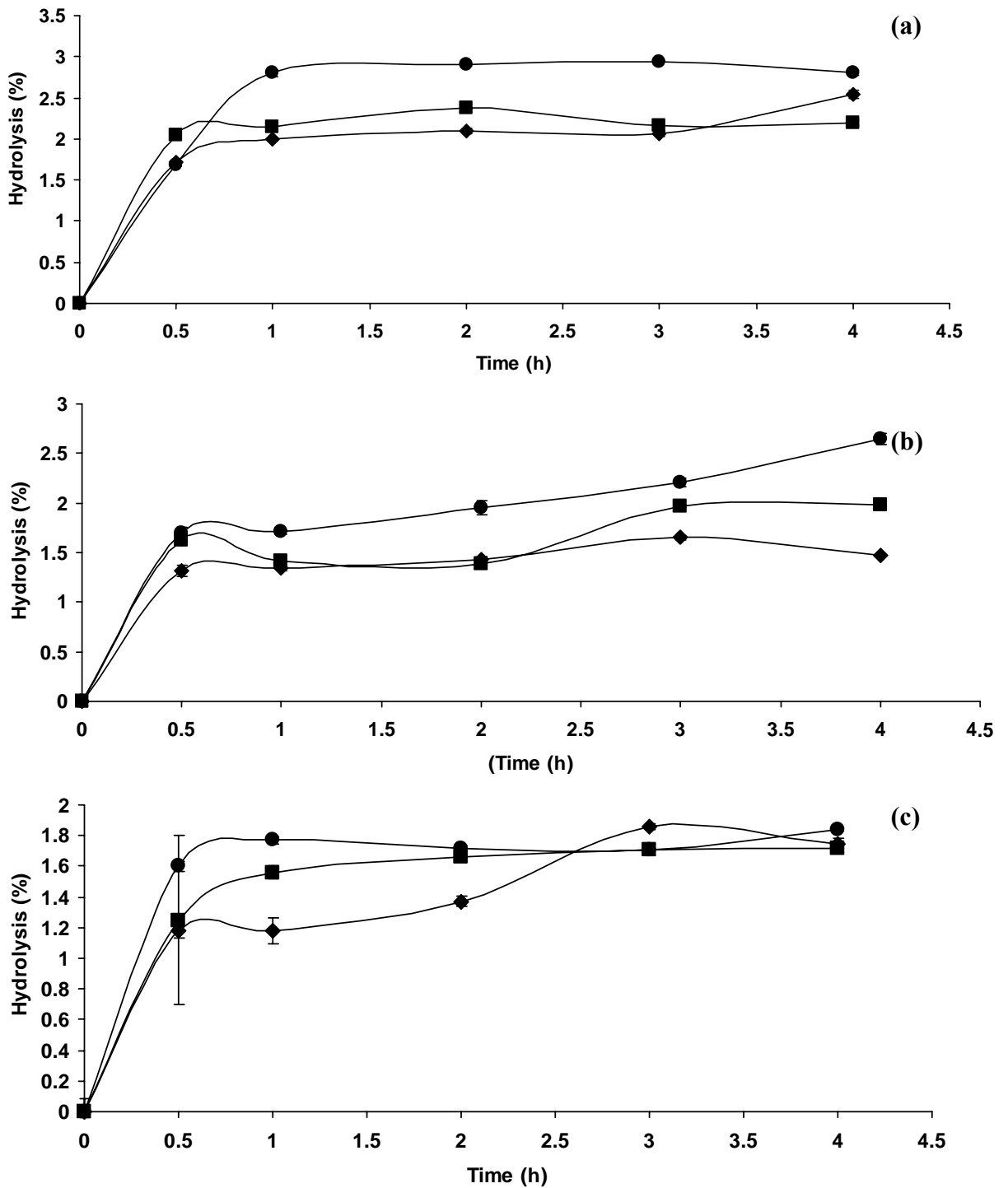


Figure 25. Hydrolysis of biopolymer from SC-S (●), SC-L (■) and biopolymer from *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate of palm oil mill (◆) in HCl buffer pH 1 (a), 2 (b) and 3 (c). The results are mean values of triplicates and error bars indicate standard deviations



จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดสูงโดยการใช้ HCl buffer ระดับพีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า พอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีมากและมีบางส่วนเท่านั้นที่ถูกย่อย และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่มีการทดสอบมาแล้วพบว่าสามารถทนการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดสูงเช่นเดียวกับ EPSs ที่ผลิตโดย *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.392 ซึ่งทดสอบความสามารถในสภาวะที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ามีเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่ถูกย่อย (Korakli, 2002) นอกจากนี้มีการศึกษาความสามารถในการทนต่อการย่อยของเลวาน (Levan) ที่ได้จากการสังเคราะห์จากน้ำตาลซูโครสโดยใช้น้ำย่อยจากกระเพาะ (gastric juice) พบว่าสารสกัดดังกล่าวถูกย่อยไปบางส่วนเท่านั้น โดยที่ผลจากการถูกย่อยโดยกรดทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ levan ลดลง (Yamamoto *et al.*, 1999) และจากการทดสอบกับโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) และ อินนูลิน (inulin) พบว่าถูกย่อยไปบางส่วนเท่านั้นซึ่งมีส่วนที่เหลือไปยังลำไส้ใหญ่ถึง 85-89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าผลจากการทดลองนี้ และเมื่อเปรียบเทียบการทนต่อการย่อยในสภาวะเป็นกรดสูงกับพรีไบโอติกชนิดอื่นที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่า พอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความสามารถทนกรดได้ดีกว่าพรีไบโอติกดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นพรีไบโอติกที่ดี ซึ่งโดยปกติที่ความเข้มข้นกรดสูงสามารถย่อยได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นกรดต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากที่ระดับความเป็นกรดสูงจะมีความรุนแรงมากกว่าจึงส่งผลต่อพันธะที่เชื่อมต่อกันของโมเลกุลน้ำตาลให้หลุดจากกันได้ง่ายกว่าสภาวะที่เป็นกรดต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gnoth และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสามารถการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากน้ำนมมนุษย์ (human milk oligosaccharides, HMOs) โดยทดสอบที่พีเอช 2.5 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การย่อยเกิดขึ้นได้น้อยมาก แต่เมื่อลดระดับพีเอชลง (<2) พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากน้ำนมมนุษย์จะถูกย่อยเพิ่มขึ้น การย่อยสารสกัดโดยกรดที่พีเอชต่างๆ อาจเกิดแบบสุ่ม ซึ่งถ้าสารพอลิเมอร์นั้นมีสารประกอบโมเลกุลใหญ่ จะมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยที่ต่ำกว่าสารพอลิเมอร์ที่มีสารประกอบโมเลกุลเล็ก ซึ่งเป็นไปได้จากการที่พอลิเมอร์เหล่านี้มีค่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สนับสนุนว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในสารพอลิเมอร์ที่สกัดด้วยเอทานอลเหล่านี้ กรณีเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารพอลิเมอร์เหล่านี้มีความสามารถในการทนต่อกรดได้สูง โดยปกติระดับพีเอชในกระเพาะอาหารในร่างกายมนุษย์โดยเฉลี่ยประมาณ 1-3 ดังนั้นสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดที่พีเอชต่างๆเหล่านี้ได้ จากการทดลองพบว่าสารพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด มีองค์ประกอบที่สามารถทนต่อ

การย่อยด้วยกรดพีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกและนำสารพอลิเมอร์เหล่านี้ไปศึกษาคุณสมบัติการเป็น 프리ไบโอติกต่อไป

### 6.3 ผลของการย่อยสารพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์ human pancreatic $\alpha$ -amylase

การทดสอบความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic  $\alpha$ -amylase เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของการเป็นสาร 프리ไบโอติก โดยเอนไซม์นี้มีความจำเพาะกับพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 ในลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงทดสอบการทนต่อการย่อยของพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase โดยการนำพอลิเมอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (จากข้อ 6.2) ซึ่งได้แก่ พอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนิ่งปาล์มทั้งสองโมเลกุลและพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้งที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์ม มาย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic  $\alpha$ -amylase ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาโดยเฉลี่ยที่อาหารถูกย่อยอยู่ในลำไส้เล็กของบุคคลปกติทั่วไป พบว่ามีเพียงสารพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มในส่วนของโมเลกุลเล็กชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อย 7.842 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยต่ำมาก ดังแสดงใน Figure 26 โดยพอลิเมอร์จากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งปาล์มมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสูงที่สุดคือ 29.908 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มในส่วนของโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยเป็น 19.625 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบความสามารถในการทนต่อการย่อยโดยกรดและเอนไซม์ที่สถานะเดียวกันของพอลิเมอร์ชีวภาพกับสารสกัดจากพืช พบว่า จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อการถูกย่อยในทางเดินอาหารขององค์ประกอบในส่วนที่ไม่ใช่แป้งของขนมปังที่ทำมาจากข้าวโพด พบว่า ไม่ถูกย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ในลำไส้เล็กของคน ขณะที่ข้าวโอ๊ต ถั่ว และมันฝรั่งมีการย่อยสลายไป 5.2, 2.9 และ 13.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เห็นได้ว่าพอลิเมอร์สามารถทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนได้ดีพอกับสาร 프리ไบโอติกจากพืชที่ได้มีการทดสอบมาแล้ว (Cumming and Englyst, 1987) ) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Wichienchot (2005) ศึกษาคุณสมบัติการทนต่อการย่อยด้วยสภาวะกรดจำลองในกระเพาะอาหารมนุษย์และทนต่อการย่อยด้วย amylase จากตับอ่อนมนุษย์ของโกลิโคเด็กเตรนที่ผลิตโดยเชื้อ *Gluconobacter oxydans* NCIMB4943 พบว่า กรดจำลองของกระเพาะอาหารไม่สามารถย่อยได้ แต่สามารถทนต่อการย่อยด้วย amylase ได้สูงสุด 25 เปอร์เซ็นต์ และ HMOs โดยทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาในช่องปาก การทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาบริเวณลำไส้เล็ก พบว่าสามารถทนต่อการย่อยได้ดี โดยเกิดการย่อยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (Gnoth *et al.*, 2000) ซึ่งใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ SC-S การที่พอลิเมอร์สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้นั้น อาจ

เนื่องมาจากพันธะที่จับกันระหว่างโมเลกุลในสายของน้ำตาลในพอลิเมอร์ชีวภาพไม่มีความจำเพาะกับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase

จากการทดสอบคุณสมบัติของฟรีไบโอติกในด้านความสามารถในการทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนซึ่งได้แก่การทนต่อการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ที่แยกจากน้ำนิ่งปาล์มส่วน โมเลกุลเล็ก (SC-S) สามารถทนต่อการย่อยได้ดีโดยมีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่โดนย่อย เนื่องจากพอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบมีความสามารถในการทนต่อการดัดซึ่งเป็นการย่อยแบบสุ่ม ทั้งนี้เนื่องจากความแข็งแรงของพันธะภายในพอลิเมอร์และจากการที่พันธะที่จับกันระหว่างโมเลกุลในสายของน้ำตาลในพอลิเมอร์ไม่มีความจำเพาะกับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะไม่มีความจำเพาะต่อพันธะ  $\alpha$ -1,4 ซึ่งสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์และแป้งที่พบในพืชนั้นมีความหลากหลาย คือประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดเชื่อมกันด้วยพันธะที่แตกต่างกัน เช่น  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,6,  $\beta$ -1,2 และ  $\beta$ -1,4 เป็นต้น (Oku and Nakamura, 2002) ดังนั้นการที่สารพอลิเมอร์เหล่านี้ถูกย่อยด้วย  $\alpha$ -amylase ได้น้อยนั้น อาจเนื่องมาจากในสายพอลิเมอร์นั้นมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่แข็งแรงและมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 น้อย ทำให้พอลิเมอร์ชีวภาพสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดี จากการการศึกษาของ Lagaert และคณะ (2007) พบว่าพอลิแซคคาไรด์ชนิด xylooligosaccharides (XOS) เป็นน้ำตาลกลุ่ม oligomers ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นเหตุให้พอลิเมอร์เหล่านี้สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็กได้ดี แต่อย่างไรก็ตามในการทดสอบการย่อยในลำไส้เล็กนั้นไม่มีเพียงแต่เอนไซม์ human pancreatic  $\alpha$ -amylase เท่านั้น ในความเป็นจริงยังมีเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ที่พบในน้ำลายโดยมีความจำเพาะเช่นเดียวกับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ที่อยู่ในลำไส้เล็ก แต่การย่อยเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเทียบกับการย่อยของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ที่อยู่ในลำไส้เล็ก นอกจากนี้ในลำไส้เล็กยังมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยพอลิแซคคาไรด์ได้ เช่น glucoamylase, maltase, lactase และ sucrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับ  $\alpha$ -1,6 และ  $\alpha$ -1,4 (Smith and Morton, 2001) ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะย่อยพอลิเมอร์ได้ในระดับหนึ่ง เนื่องจากพอลิเมอร์ SC-S และ SC-L น่าจะเป็นพอลิเมอร์ชนิดอะราบิโนไซแลนซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 และมีโซ่กิ่งที่เป็นน้ำตาลอะราบิโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,2 หรือ  $\alpha$ -1,3 (Taylor *et al.*, 2006; Grootaert *et al.*, 2007) และมีกรดกลูคูโรนิกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,2 นอกจากนี้ยังมีโซ่กิ่งที่เป็นโอลิโกเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนสเชื่อมกับน้ำตาลไซโลสด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,3 หรือ  $\alpha$ -1,2 และกาแลคโตสเชื่อมกับน้ำตาลไซโลสด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 หรือเชื่อมกับน้ำตาลอะราบิโนสด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,5 อีกด้วย (Saha, 2003) และพอลิเมอร์จากเชื้อราเป็นชนิดกลูแคนมีกาแลคโตสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,3 (Methacanon *et al.*, 2005) ทำให้ถูกย่อยได้น้อย และจากการศึกษาของ Mcpherson และ Jane

(1999) พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีในกลุ่มมันต่างๆ พบว่ามีปริมาณ 25-35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะประกอบด้วย non starch polysaccharide, dietary fiber, amylase (15-20 เปอร์เซ็นต์) และ amylopectin เป็นต้น จากการทดลองครั้งนี้พบว่าพอลิเมอร์ SC-S ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้ดี คาดว่าในสายพอลิเมอร์น่าจะมีองค์ประกอบของ amylase อยู่เล็กน้อย และอาจมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีพันธะหลากหลายซึ่งสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดี การที่พอลิเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดีกว่าถูกย่อยด้วยกรด อาจเนื่องมาจากพอลิเมอร์ได้ผ่านการย่อยด้วยกรดแบบสุ่มซึ่งไม่จำเพาะต่อพันธะภายในโมเลกุลทำให้เหลือพอลิเมอร์ที่มีสายโมเลกุลสั้นๆ เมื่อนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะต่อพันธะในการที่จะเข้าไปย่อยภายในโมเลกุลนั้นๆ ทำให้เกิดการย่อยได้มากกว่าการย่อยด้วยกรด

จากการพิจารณาการถูกย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ของพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งสามชนิดคือ พอลิเมอร์ SC-S, SC-L และจากเชื้อราที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าลัม พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยเท่ากับ 10.652, 21.825 และ 32.448 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน Figure 27 ซึ่งพอลิเมอร์ SC-L สามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดได้สูงสุด รองลงมาคือพอลิเมอร์จากเชื้อราและพอลิเมอร์ SC-S ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเริ่มต้นที่มีอยู่ในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆก่อนนำไปย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ พบว่าพอลิเมอร์จากเชื้อรามีปริมาณ 20.373 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลัมชนิด SC-S และ SC-L มีปริมาณ 10.255 และ 11.488 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยด้วยกรดและเอนไซม์เหลืออยู่ทั้งหมดเท่ากับ 67.552, 89.348 และ 78.175 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองจะบ่งบอกได้ว่าในพอลิเมอร์เหล่านี้มีองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมโดยทางเดินอาหารส่วนต้น และมีโอกาสเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นพอลิเมอร์จากเชื้อรา ซึ่งจากการศึกษาการเป็นสารพรีไบโอติกที่คั้นนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ได้ และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) และอินนูลิน (inulin) สามารถทนต่อการถูกย่อยด้วยทางเดินอาหารส่วนบน และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ถึง 85-89 เปอร์เซ็นต์ (Cumming *et al.*, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Englyst และ Cumming (1987) พบว่าในข้าวโอ๊ต กลัวย และมันฝรั่ง มี non starch polysaccharide เหลืออยู่มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทดสอบการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน ในการที่มีปริมาณของพอลิเมอร์เหลือไปยังลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยถูกย่อยได้ในช่วง 7.8–29.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลัม SC-S ไปใช้ในการทดลองต่อไปเพราะถูกย่อยได้น้อยที่สุด

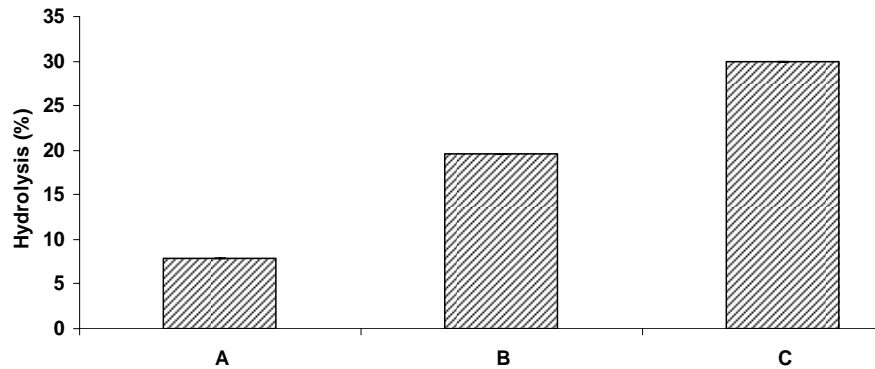


Figure 26. Enzymatic hydrolysis of two biopolymers from sterilizer condensate SC-S (A), SC-L (B) and *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (C)

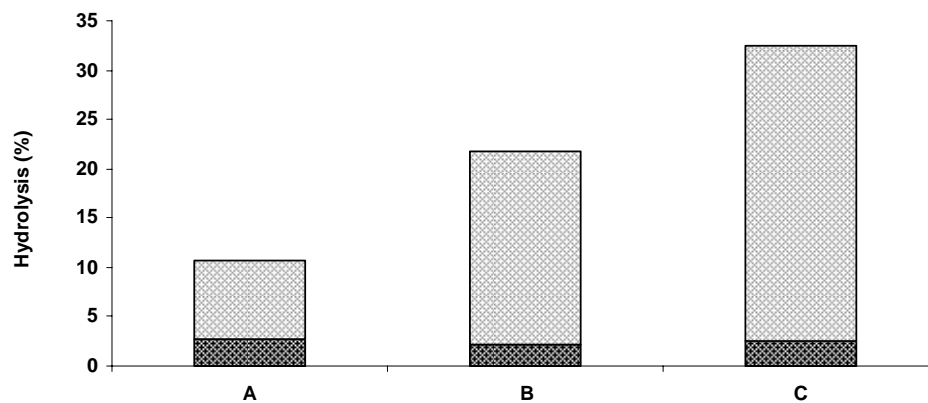


Figure 27. Percentage of hydrolysis (reducing sugar/(total sugar content – initial reducing sugar) x 100) of the extract by using HCl at pH 1 (■) and human pancreatic  $\alpha$ -amylase (▨) of ethanolic extracts from sterilizer condensate; SC-S (A), SC-L (B) and *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate (C)

#### 6.4 ผลของการใช้พอลิเมอร์เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

นอกจากคุณสมบัติการทนต่อการย่อยโดยกรดและเอนไซม์ในทางเดินอาหาร ส่วนบนแล้วพรีไบโอติกจะต้องสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ได้ด้วย เมื่อทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus plantarum* โดยใช้พอลิเมอร์ที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 6.3) คือ พอลิเมอร์จากน้ำนึ่งปาล์มขนาดโมเลกุลเล็ก (SC-S) มาเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อ *L. acidophilus* เจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแบคทีเรียโปรไบโอติกเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก และมีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 1.20 log CFU/ml หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อค่อยๆ ลดลง

เมื่อเวลาครบ 72 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้พอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มที่คัดเลือกได้เป็นแหล่งคาร์บอนเชื่อมีการเจริญเพิ่มขึ้นน้อยมาก โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง คือมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 0.67 log CFU/ml และการเจริญลดลงจนครบเวลา 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อที่ 24 ชั่วโมง ในชุดการทดลองที่ใช้พอลิเมอร์ที่คัดเลือกได้เป็นแหล่งคาร์บอนกับชุดการทดลองที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (0.25 log CFU/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง) พบว่า มีการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าการเจริญของ *L. acidophilus* ในอาหารที่มีพอลิเมอร์ต่ำกว่าการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จึงสรุปได้ว่าพอลิเมอร์สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* ได้น้อยมาก (Figure 28a)

เมื่อพิจารณาการใช้พอลิเมอร์ที่คัดเลือกได้กับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนของ *L. plantarum* ในการเจริญ พบว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน โดยมีแนวโน้มการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มเวลาในการเลี้ยง และเชื่อจะเจริญได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง คือจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 1.175 log CFU/ml และหลังจากนั้นจำนวนเชื้อมีแนวโน้มลดลงจนครบชั่วโมงในการเลี้ยง (72 ชั่วโมง) จากการศึกษาผลของพอลิเมอร์ชีวภาพ SC-S ต่อการส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. acidophilus* โดยเชื่อมีการเจริญค่อยๆเพิ่มขึ้นใน 12 ชั่วโมงแรก คือจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เป็น 0.89 log CFU/ml และมีการเจริญสูงสุดเป็น 1.175 log CFU/ml (ที่ 24 ชั่วโมง) และเชื่อมีแนวโน้มลดลงจนครบชั่วโมงในการเลี้ยง (72 ชั่วโมง) ซึ่ง *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีพอลิเมอร์ SC-S เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งไม่แตกต่างกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสที่เวลาเดียวกัน (24 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน (0.43 log CFU/ml) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *L. plantarum* สามารถใช้พอลิเมอร์ที่คัดเลือกได้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ (Figure 28b) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *L. plantarum* สามารถผลิตเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสารพอลิเมอร์ชนิดนี้ เพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานของเซลล์และช่วยในการเจริญ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการส่งเสริมการเจริญของพอลิเมอร์ชีวภาพใน *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง พบว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีกว่า *L. acidophilus* เนื่องจาก *L. plantarum* สามารถใช้สารที่มีโมเลกุลใหญ่ได้ดีกว่า *L. acidophilus* (Kaplan and Hutkins, 2000) และจากการรายงานของ Sako และคณะ (1999) พบว่า

แบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถใช้ lactulose และ raffinose ได้ใกล้เคียงกับกลูโคส ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วย

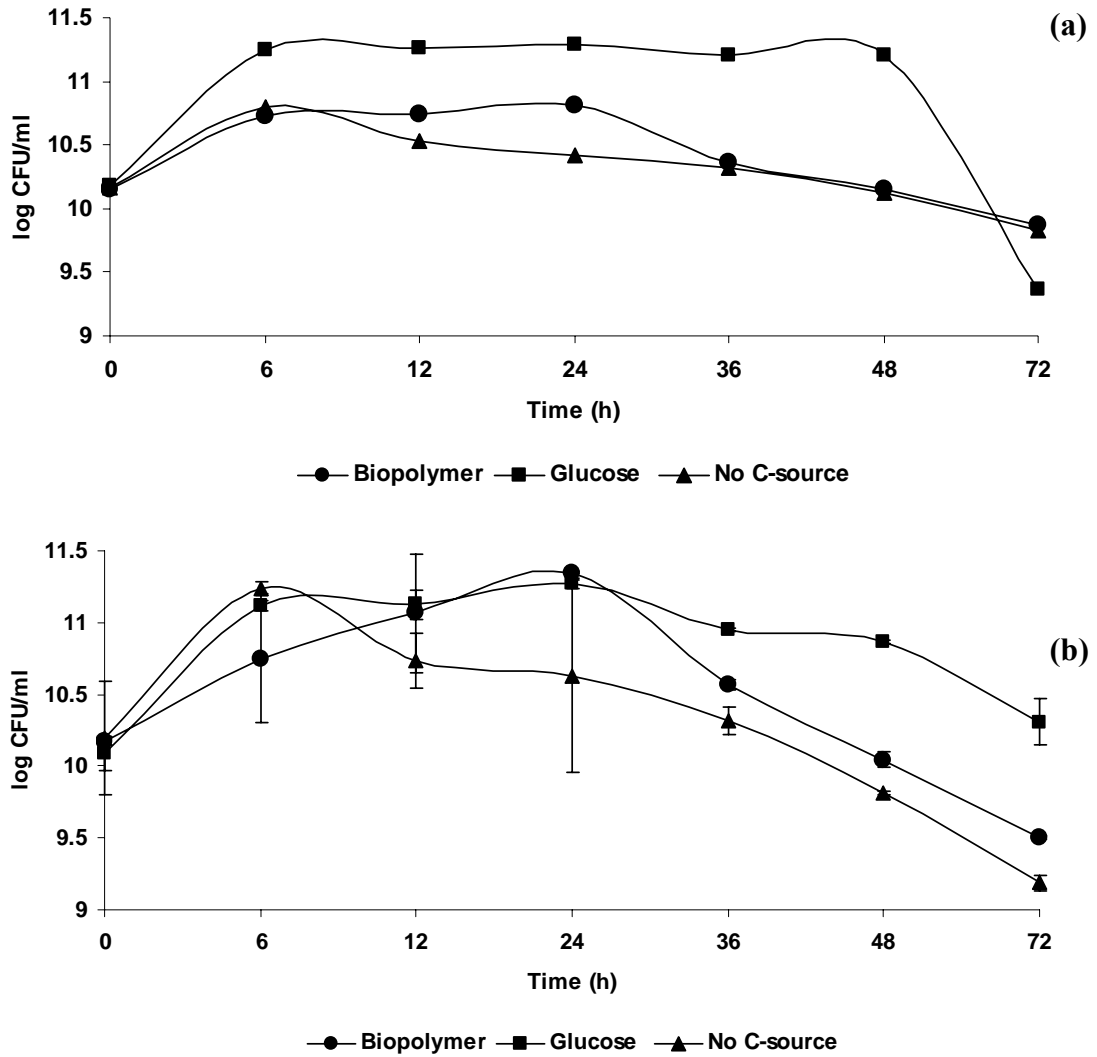


Figure 28. Growth of probiotic in minimal medium containing polymer from sterilizer condensate (SC-S) (●), glucose (■) as a carbon source and without carbon source (▲); *Lactobacillus acidophilus* (a) and *L. plantarum* (b). The results are mean values of triplicates and error bars indicate standard deviations

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดในรูปของน้ำตาลทั้งหมด แล้วเปรียบเทียบกับน้ำตาลทั้งหมด (พอลิเมอร์ชีวภาพ) ที่เติมลงไปตอนเริ่มต้นพบว่า *L. plantarum* สามารถใช้พอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งปาล์มไปในการเจริญได้อย่างรวดเร็วในช่วง 12 ถึง 36 ชั่วโมง และมีแนวโน้มคงที่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาการเจริญในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า เชื้อมีการเจริญดีในช่วง 24 ชั่วโมงแรก มีปริมาณ 11.35 logCFU/ml แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 ปริมาณเชื้อลดลงเป็น 10.57 logCFU/ml และลดลงเรื่อยๆ จนถึง 72 ชั่วโมง (Figure 29b) ในขณะที่การใช้พอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งปาล์มของ *L. acidophilus* (Figure 29a) เพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 24 ชั่วโมง และหลังจาก 36 ชั่วโมง มีแนวโน้มคงที่จนถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อพิจารณาการเจริญในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า มีลักษณะการเจริญเหมือนกับ *L. plantarum* โดยเชื้อมีการเจริญใน 24 ชั่วโมงแรก (10.81 logCFU/ml) แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 ปริมาณเชื้อลดลงเป็น 10.36 logCFU/ml และลดลงเรื่อยๆ จนครบ 72 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงแรกที่เชื้อมีการเจริญนั้นเชื้อนำสารอาหารจากแหล่งอื่นไปใช้ก่อนเพราะในความเป็นจริงจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารที่สามารถใช้ได้ง่ายก่อน เนื่องจากใน minimal medium มีปริมาณยีสต์สกัดและเปปโตโนอยู่อย่างละ 2 กรัมต่อลิตร เมื่อสารอาหารในส่วนนี้ถูกใช้หมดไป เชื้อจึงนำแหล่งคาร์บอนจากพอลิเมอร์มาใช้แต่เนื่องจากพอลิเมอร์มีโครงสร้างที่ซับซ้อนยากต่อการย่อยได้สมบูรณ์เนื่องจากพอลิเมอร์ SC-S เป็นพอลิเมอร์ชนิดเฮมิเซลลูโลสซึ่งอยู่ในกลุ่มอะราบีโนไซแลน ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นโซ่หลัก มีน้ำตาลอะราบีโนสและ/หรือกาแลคโตสเป็นกิ่ง ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ endo-1,4- $\beta$ -xylanase และ  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 arabinofuranosidase สำหรับย่อยสายของน้ำตาลไซโลสและอะราบีโนส นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลของกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และเฟอร์ูลิก (ferulic acid) เป็นองค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกด้วย (Taylor *et al.*, 2006; Grootaert *et al.*, 2007) แต่เนื่องจากเชื้อในกลุ่มแลคติกไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้มาย่อยพอลิเมอร์ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปใช้ได้ อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารที่เติมกลูโคสและในอาหารที่เติมพอลิเมอร์ พบว่าในอาหารที่เติมกลูโคสมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าในอาหารที่เติมพอลิเมอร์ถึง 4 เท่า (Figure 29) จึงทำให้เชื้อไม่มีสารอาหารที่เพียงพอสำหรับการเจริญต่อ ส่งผลให้การเจริญของเชื่อน้อยกว่าในอาหารที่มีกลูโคสและเชื้อมีการเจริญลดลง เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* และ *L. acidophilus* พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ โปรไบโอติกจะค่อยๆมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 36 ชั่วโมงแรก และมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนครบ 72 ชั่วโมง โดยเชื้อใช้พอลิเมอร์ได้ไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเริ่มต้น ซึ่งเชื้อ *L. plantarum* สามารถนำไปใช้มากที่สุดคือ 35.71 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่ *L. acidophilus* มีการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพคิดเป็น 22.89 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 36



ชั่วโมง (Figure 29) ในลำไส้มนุษย์มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสารอะราบีโนไซแลน ซึ่งได้แก่ lactobacilli, bacteroides และ non-pathogenic clostridia โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนได้ เช่น *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus* และ *Bacteroides thetaiotaomicron* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ depolymerizing ได้หลายชนิด (Grootaert *et al.*, 2007) Kontula และคณะ (2000) ศึกษาการใช้อะราบีโนไซแลนโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากข้าวไรย์และข้าวไรย์เป็นสับสเตรทต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากการตัดชิ้นเนื้อลำไส้ของมนุษย์ พบว่าอะราบีโนไซแลนโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยส่งเสริม lactobacilli บางสายพันธุ์เท่านั้น (*Lactobacillus cellobiosus* และ *Lactobacillus salivarius*) ในขณะที่สายพันธุ์อื่นไม่สามารถเจริญบนสับสเตรทนี้ได้ (*Lactobacillus rhamnosus* และ *Lactobacillus salivarius*) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus rhamnosus* (GG) และแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* โดยใช้อะราบีโนไซแลนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากรำข้าวโอ๊ตเป็นสับสเตรท ผลการทดลองพบว่าไม่มีแบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่สามารถเจริญบนสับสเตรทนี้ได้เลย อาจเป็นเพราะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสก่อนทำการทดลองในอาหารที่เติมใช้อะราบีโนไซแลนโอลิโกแซคคาไรด์แทนกลูโคสจึงทำให้เกิดการยับยั้งสารแคทาบอลิต์ของเอนไซม์ (Kontula *et al.*, 1998)

เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้พอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 มีการเปลี่ยนแปลงของระดับพีเอชน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคส โดยการเจริญของ *L. plantarum* มีพีเอชลดลงจากพีเอชเริ่มต้น 5.78 เป็น 5.02 (Figure 30b) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ *L. plantarum* เกิดจากแบคทีเรียสามารถผลิตกรดขึ้นมา กรดที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญ *L. plantarum* คือ กรดแลคติก นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่นอีก เช่น กรดอะซิติก กรดบิวเทอริก และกรดโพรพิโอนิก ซึ่งกรดเหล่านี้จะส่งผลให้ระดับพีเอชในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียลดลง และยังบ่งบอกถึงความสามารถในการใช้สารอาหารและการเจริญของแบคทีเรียอีกด้วย และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ *L. acidophilus* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับพีเอชน้อยกว่าในการเจริญของ *L. plantarum* เพียงเล็กน้อย โดยมีพีเอชลดลงจากพีเอชเริ่มต้น (5.62) เป็น 5.08 (Figure 30a) และเมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญในอาหารที่มีกลูโคสของ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* พบว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชลดลงถึง 3.44 และ 3.46 ตามลำดับ

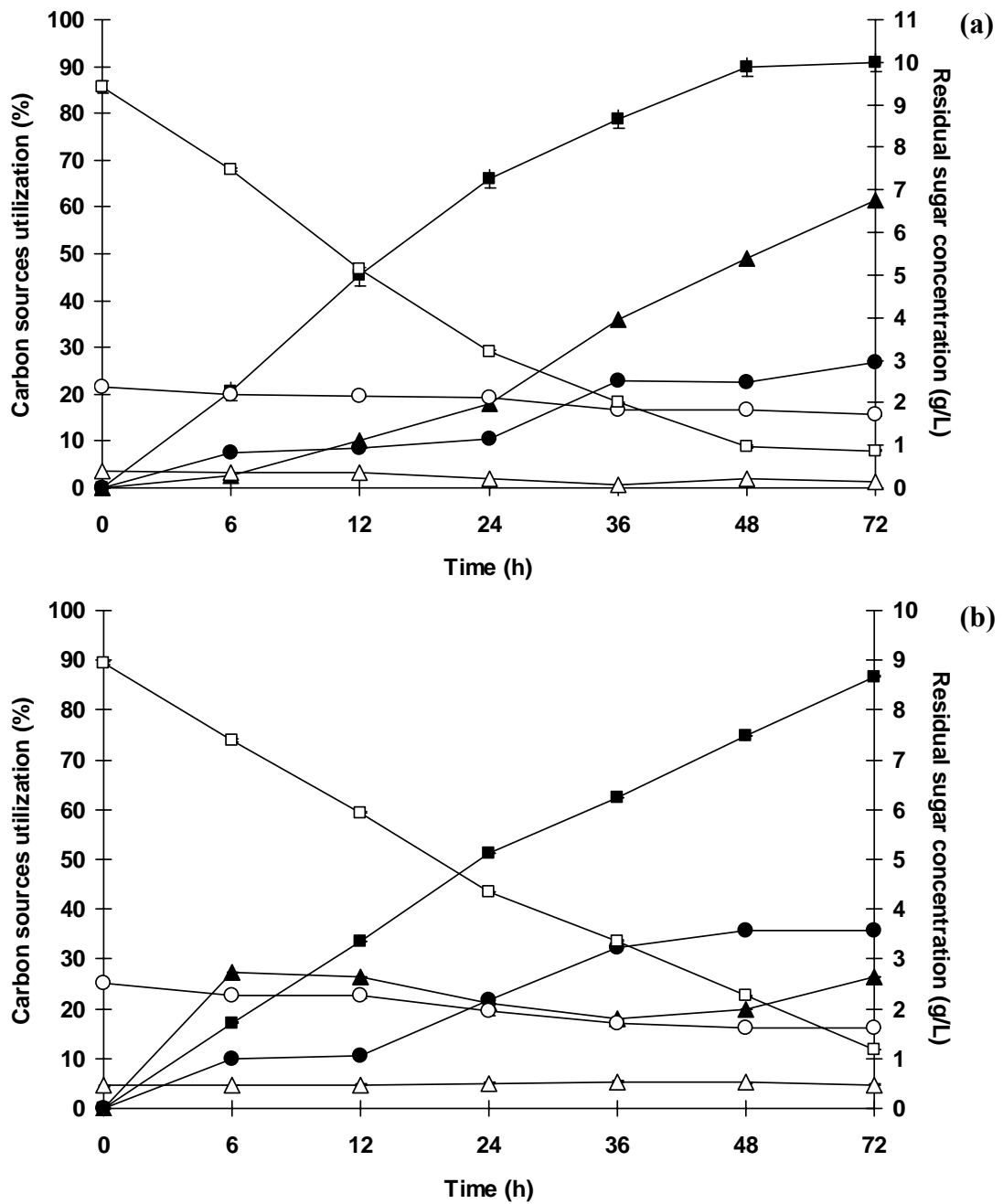


Figure 29. Percentage of carbon sources utilization by *Lactobacillus acidophilus* (a) and *L. plantarum* (b) in minimal medium containing polymer from sterilizer condensate SC-S (●) and glucose (■) as a carbon source and without carbon source (▲) at 37 °C for 72 hours and residual sugar concentration for polymer (○), glucose (□) and without carbon source (△). The results are mean values of triplicates error bars indicate standard deviations

คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกที่ดีต้องสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกายได้ ซึ่งพบว่าเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของพอลิเมอร์ชีวภาพ SC-S ต่อการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกในร่างกาย พบว่าพอลิเมอร์ SC-S ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยเฉพาะขนาดโมเลกุลของสารอาหาร โดยพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสามารถใช้สารอาหาร โมเลกุลเล็กได้ดีกว่าสารอาหาร โมเลกุลใหญ่ (Olano-Martin *et al.*, 2000) จากการทดลองพบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถใช้พอลิเมอร์ SC-S (มีขนาดโมเลกุล 1,233 คาลตัน) ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (51.34 และ 65.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยเชื้อสามารถใช้พอลิเมอร์เป็นแหล่งคาร์บอนได้เพียง 21.82 และ 10.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่างจากการทดลองของนิรันดรา บุญตัน (2550) ที่พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* สามารถใช้สารสกัดจาก บีทรูท และมันฝรั่งได้ดี โดย *L. plantarum* สามารถใช้สารสกัดจากบีทรูทได้ดี (80.19 เปอร์เซ็นต์) และสามารถใช้อาหารสกัดจากมันฝรั่ง (63.65 เปอร์เซ็นต์) ได้ดีพอกับการใช้กลูโคส (61.46 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ *L. acidophilus* สามารถใช้สารสกัดจากมันฝรั่ง (33.82 เปอร์เซ็นต์) และบีทรูท (25.75 เปอร์เซ็นต์) ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคส (63.05 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด พบว่าสารสกัดจากมันฝรั่งมีขนาดน้ำหนักอยู่ในช่วง 1624 และ 3065 คาลตัน และสารสกัดจากบีทรูทมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 464 และ 1603 คาลตัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่ใช่เพียงแต่ขนาดโมเลกุลของสารอาหารเท่านั้นที่มีผลต่อการนำไปใช้ของเชื้อ แต่อาจจะมีปัจจัยอื่นร่วมด้วยเช่น พันธะและโครงสร้างการเรียงตัวของโมเลกุลน้ำตาล ชนิดของน้ำตาล รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์มาย่อยพอลิเมอร์ของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกอีกด้วย

นอกจากนี้ความสามารถในการใช้สารอาหารหรือสารพรีไบโอติกของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะ (Olano-Martin *et al.*, 2002) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus plantarum* สามารถใช้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ได้ แต่ไม่สามารถใช้ไซแลน (xylan) ได้ (Crittenden *et al.*, 2002) และ *Bifidobacteria adolescentis* สามารถใช้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ อะราบิโนไซแลน และอะราบิโนไซแลนโอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่ไม่สามารถใช้ไซแลนได้เช่นกัน (Crittenden *et al.*, 2002 and van den Broek *et al.*, 2005) การที่แบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้ไม่เท่ากันเนื่องจากความหลากหลายในเรื่องของโครงสร้างและการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโมเลกุลเหล่านั้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกจะมีองค์ประกอบและการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะภายในโมเลกุลต่างกัน เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharide) จะต่อกันด้วย

Fru $\beta$ 2-1Fru $_n$  และ Glu $\alpha$ 1-2[ $\beta$ Fru1-2] $_n$ , ราฟฟิโนส (raffinose) จะต่อกันด้วย Gal $\alpha$ 1-6Glu1-2 $\beta$ Fru, แลคโตซูโครส (lactosucrose) จะต่อกันด้วย Gal $\beta$ 1-4Glu $\alpha$ 1-4Glu $\alpha$ 1-2 $\beta$ Fru และไซโลโอลิแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) จะต่อกันด้วย [xyl $\beta$ 1-4xyl] $_n$  เป็นต้น (Mussatto and Mancilha, 2007) ดังนั้นแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสารเหล่านี้เพื่อที่จะนำสารเหล่านี้ไปใช้ ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นจะมีความจำเพาะต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ พบว่า *L. plantarum* สามารถผลิตเอนไซม์  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase และ  $\alpha$ -mannosidase ขึ้นมาได้ และไม่พบการสร้างเอนไซม์  $\alpha$ -galactosidase และ  $\alpha$ -glucosidase ใน *L. acidophilus* (Papamanoli *et al.*, 2003) ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตขึ้นมาจะมีความจำเพาะต่อพันธะที่เชื่อมต่อกันภายในพอลิเมอร์ ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิเมอร์ SC-S พบว่าเป็นกลุ่มของไซโลส และอะราบินอส ซึ่งน่าจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ ,1-4,  $\beta$ ,1-2 และ  $\alpha$ ,1-2,  $\alpha$ ,1-3 โดยปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบจะเป็นกลุ่มไซโลสเป็นส่วนใหญ่จึงจัดได้ว่าพอลิเมอร์ในกลุ่มไซเลนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถใช้สารพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มชนิด SC-S เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีเท่าน้ำตาลกลูโคส

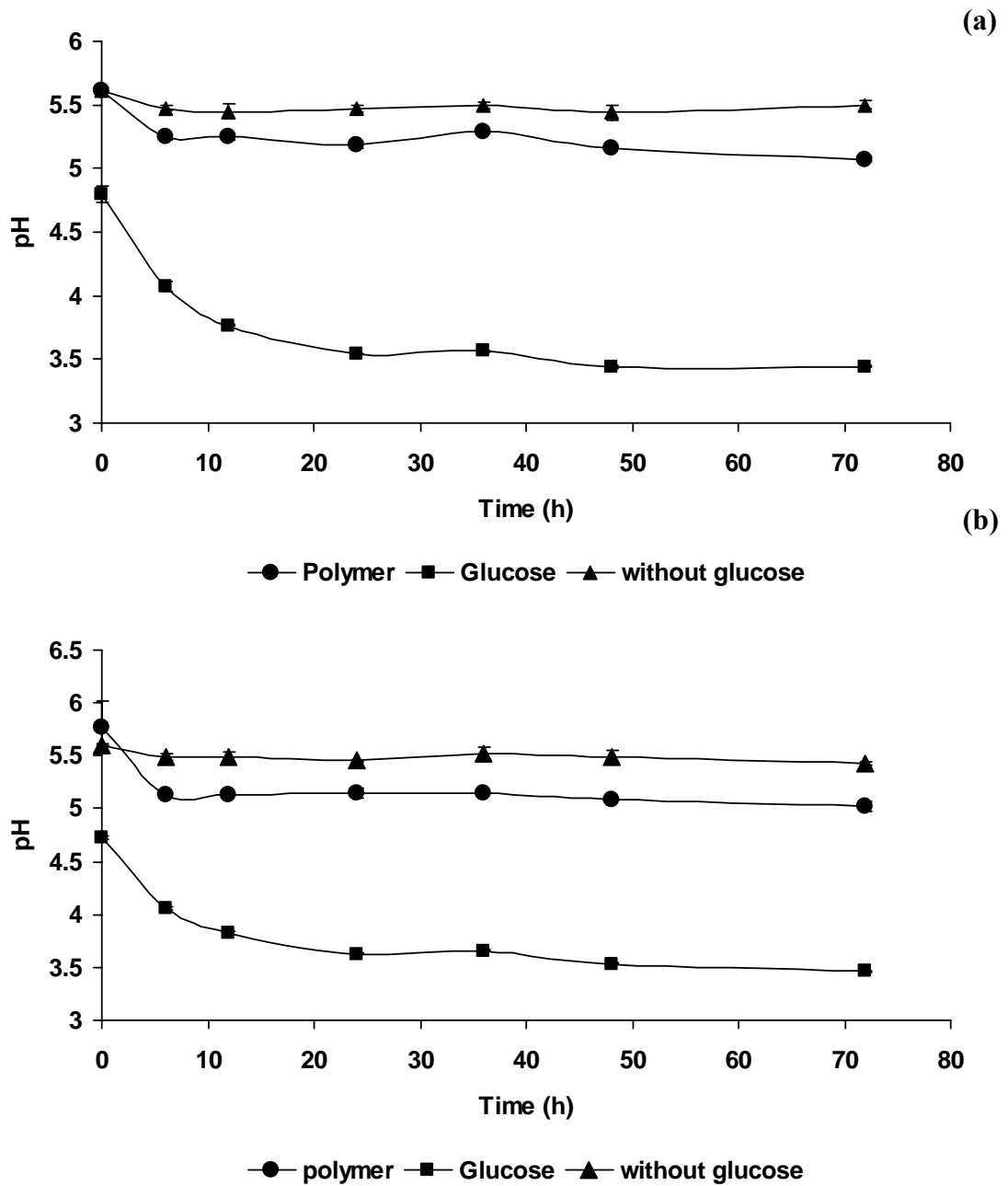


Figure 30. The pH change in anaerobic fermentation by *Lactobacillus acidophilus* (a) and *L. plantarum* (b) in minimal medium using polymer from sterilizer condensate SC-S (●), glucose (■) as carbon sources and without carbon source (▲) at 37 °C for 72 hours. The results are mean values of triplicates and error bars indicate standard deviations

## 7. คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพในสารละลายดินขาว

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนของพอลิเมอร์จากน้ำนึ่งปาล์มส่วนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเล็กและโมเลกุลใหญ่ (SC-S และ SC-L ตามลำดับ) และ *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนึ่งปาล์ม ในสารละลายดินขาว (kaolin) ภายใต้สภาวะพีเอช 7.0 และมีคาร์ดิเมียม  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (40 มิลลิโมลาร์) โดยใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 21) พบว่า พอลิเมอร์ทั้งสามชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพเนื่องจากมีกิจกรรมการตกตะกอน โดยค่ากิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ทั้งสามชนิดคือ SC-S, SC-L และ *C. dipterrigena* BCC2073 มีค่าใกล้เคียงกันคือมีค่าเท่ากับ  $2.185 \pm 0.013$ ,  $1.809 \pm 0.023$  และ  $1.948 \pm 0.011$  ตามลำดับ และมีอัตราการตกตะกอนเท่ากับ  $45.876 \pm 0.013$ ,  $41.237 \pm 0.023$  และ  $43.041 \pm 0.011$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกิจกรรมและอัตราการตกตะกอนจะดีที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างคือปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม เช่น อีออนของโลหะ ความเข้มข้นของอีออนของโลหะ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และพีเอช เป็นต้น (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001)

Table 21. Flocculating activity of biopolymer from sterilizer condensate of palm oil mill and *C. dipterrigena* BCC2073 cultivated in sterilizer condensate of palm oil mill in kaolin clay suspension. Different letters were significant differences ( $P < 0.05$ )

Biopolymer	Kaolin suspension
	Flocculating activity
SC-S	$2.185 \pm 0.013^a$
SC-L	$1.809 \pm 0.023^b$
<i>C. dipterrigena</i> BCC2073	$1.948 \pm 0.011^b$

## 8. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพในสารละลายดินขาว

### 8.1 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนของพอลิเมอร์ที่สกัดจากน้ำนิ่งป่าลัม (SC-S และ SC-L) และจากเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 ในสารละลายดินขาว (kaolin) ภายใต้สภาวะพีเอช 7.0 และมีการเติม  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (4.5 mM) โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (Figure 31) พบว่ากิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์จาก SC-S ให้ค่าสูงกว่า SC-L และพอลิเมอร์จากเชื้อรา *C. dipterrigena* BCC2073 จาก Figure 28 แสดงผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ทั้งสามชนิดต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนในสารละลายดินขาว (5 กรัมต่อลิตร) ที่เติม  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.5 มิลลิโมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 7.0 โดยการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นของพอลิเมอร์ตั้งแต่ 2 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิเมอร์ SC-S และ SC-L คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์จาก *C. dipterrigena* BCC2073 ให้ค่าการตกตะกอนที่เหมาะสมที่ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพอลิเมอร์ SC-S ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด รองลงมาคือพอลิเมอร์จาก *C. dipterrigena* BCC2073 และพอลิเมอร์ SC-L โดยมีค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ  $2.278 \pm 0.011$ ,  $1.087 \pm 0.025$  และ  $0.904 \pm 0.106$  และกิจกรรมการตกตะกอนค่อยๆ ลดลงหลังจากเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพมากขึ้น จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ 2 ประการคือ ประการแรกเกิดจากการที่มีพอลิเมอร์ชีวภาพมากเกินไปทำให้เกิดการแพร่กระจายที่ไม่สมบูรณ์ของพอลิเมอร์ ซึ่งมีเฉพาะโมเลกุลพอลิเมอร์ที่ล้อมรอบอนุภาคดินขาวเท่านั้นที่ส่งผลต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอน โดยอนุภาคพอลิเมอร์ที่เหลือไม่สามารถเข้าส่งเสริมหรือช่วยให้เกิดปฏิกิริยาให้สูงขึ้นได้ (Yokoi *et al.*, 1997) ประการที่สองคือ พอลิเมอร์ที่มีปริมาณมากเกินไปอาจมีผลทำให้ที่ตำแหน่งยึดเกาะของบริเวณพื้นผิวของอนุภาคดินขาวมีความอึดตัวทำให้ไม่มีพื้นที่ให้อนุภาคอื่นเข้ายึดเกาะ ดังนั้นแรงดึงดูดของอนุภาคพอลิเมอร์ที่เหลือจึงลดลงและส่งผลให้กิจกรรมการตกตะกอนลดลง (Kwon *et al.*, 1996) และเมื่อพิจารณาลักษณะของพอลิเมอร์ชีวภาพ พบว่าจากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FT-IR พอลิเมอร์ชีวภาพทั้งสามชนิดมีหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายกัน โดยมีหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิล โดยเฉพาะหมู่คาร์บอกซิลมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์นั้นๆ เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลสามารถไปจับกับไอออนโลหะประจุสองบวก (Ha *et al.*, 1991) แต่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันโดยพอลิเมอร์ SC-S, SC-L และพอลิเมอร์จาก *C. dipterrigena* BCC2073 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1223, 6431 และ 20064 คาลตัน ตามลำดับ จากผลตรงนี้ช่วยเสริมเหตุผล 2 ประการที่ได้กล่าวมา โดยที่พอลิเมอร์ SC-S มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กอาจทำให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนได้ดีกว่า ซึ่งต่างกับพอลิเมอร์อีกสองชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า ทำให้ไปบังหรือกีดขวางทำให้โลหะแคทไอออนเข้า

จับกับประจุบนอนุภาคดินขาวได้ไม่ดี จึงเกิดกิจกรรมการตกตะกอนต่ำ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพอลิเมอร์ชีวภาพและกิจกรรมการตกตะกอนแบบนี้มีความคล้ายคลึงกับกิจกรรมการตกตะกอนของสารตกตะกอนชีวภาพชนิดพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Enterobacter cloacae* WD7 โดยใช้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยดินขาวสูงที่สุดเท่ากับ 105 เมื่อใช้  $\text{CaCl}_2$  ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และระดับพีเอชที่เหมาะสมในการตกตะกอนอยู่ในช่วง 2-8 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของพอลิแซคคาไรด์สูงกว่านี้พบว่ากิจกรรมการตกตะกอนลดลง (Prasertsan *et al.*, 2006) และสารตกตะกอนชีวภาพชนิด Poly( $\gamma$ -glutamic acid) (PGA) ที่ความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุด ( $30.32 \pm 1.4$ ) ในสารละลายดินขาวพีเอช 7.5 ที่เติมโลหะชนิด  $\text{Ca}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 8.0 มิลลิโมลาร์ โดยพอลิเมอร์ชีวภาพมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ  $6.2 \times 10^6$  ดาลตัน (Bajai and Singhal, 2009) แต่ช่วงความเข้มข้นจากการทดลองนี้มีความแตกต่างจากที่เคยมีรายงานมา เช่น จากรายงานของ Yokoi และคณะ (2002) ศึกษากิจกรรมการตกตะกอนของสารละลายเพคติน (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ  $6.2 \times 10^6$  ดาลตัน) (ที่แยกได้จากแอปเปิ้ล) ในสารละลายดินขาว (kaolin clay) พบว่า มีกิจกรรมการตกตะกอนเกิดได้สูงสุดเมื่อเติมสารละลายเพคตินเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ  $\text{Fe}^{3+}$  0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองนี้จึงคัดเลือกพอลิเมอร์ SC-L ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปใช้ในการศึกษาปัจจัยในข้อต่อไป

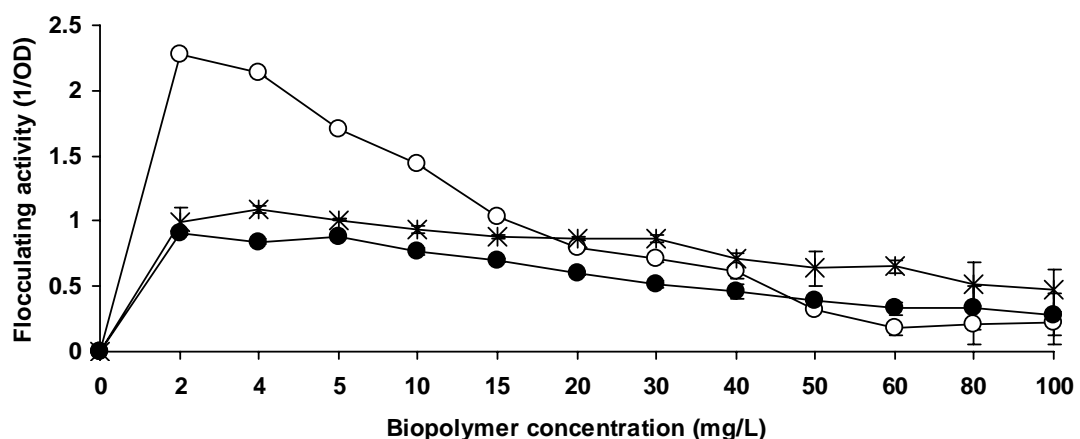


Figure 31. Effect of biopolymer concentration on flocculating activity using biopolymer from SC-S (○), SC-L (●) and *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 (\*) at various biopolymer concentrations; 2, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100 mg/L in kaolin clay suspension (5 g/L) at pH 7.0 supplemented with 4.5 mM  $\text{CaCl}_2$



## 8.2 ผลของชนิดไอออนโลหะ

โลหะชนิดแคทไอออนช่วยส่งเสริมการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนโดยการทำให้เกิดสภาพความเป็นกลาง และช่วยปรับสภาพประจุลบที่เหลือของ functional groups โดยเกิดจากการจับกันระหว่างอนุภาคดินขาวกับแคทไอออน ทำให้ประจุลบที่ผิวของอนุภาคดินขาวลดลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนประจรรอบๆอนุภาคดินขาวจากประจุลบเป็นประจุบวก (Bajai and Singhal, 2009) จากการศึกษาของ Yokoi และคณะ (1997) กล่าวว่า แคทไอออนสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาการเกิดกิจกรรมการตกตะกอน โดยเกิดสภาพความเป็นกลางโดยการปรับสภาพของประจุลบในหมู่คาร์บอกซิลของกรดยูโรนิก (uronic acid) ในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรด (acidic polysaccharide) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยการเติมแคทไอออนลงในการตกตะกอนที่สำคัญคือ ความเข้มข้นและวาเลนซ์ (valency) ของไอออน (Yokoi *et al.*, 1995; Wu and Ye, 2007) จาก Figure 32 แสดงผลของชนิดแคทไอออนและความเข้มข้นต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ จากการศึกษาผลของชนิดของไอออนของโลหะ 3 กลุ่มคือ แคทไอออนประจุสามบวก (trivalent cation) ( $AlCl_3$  และ  $FeCl_3$ ), แคทไอออนประจุสองบวก (divalent cation) ( $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $CuCl_2$  และ  $CaCl_2$ ) และแคทไอออนประจุหนึ่งบวก (monovalent cation) ( $KCl$  และ  $NaCl$ ) ต่อกิจกรรมการตกตะกอนในสารแขวนลอยดินขาว พีเอช 7.0 และพอลิเมอร์ SC-S 2 มีลิกนินต่อลิตร พบว่า การเติมแคทไอออนประจุหนึ่งบวก ( $KCl$  และ  $NaCl$ ) มีผลช่วยให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนได้น้อยมากเมื่อเทียบกับแคทไอออนประจุสองและสามบวก เนื่องจากไอออนกลุ่มนี้ ( $K^+$  และ  $Na^+$ ) การจับกันระหว่างพันธะมีแรงน้อย ส่งผลให้โครงสร้างของฟลอคจับกันแบบหลวมๆ ดังนั้น จึงทำให้กิจกรรมการตกตะกอนเกิดขึ้นได้น้อย (Wu and Ye, 2007; Gong *et al.*, 2008; Bajai and Singhal, 2009) และต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 20 มิลลิโมลาร์ สำหรับ  $KCl$  และมากกว่า 60 มิลลิโมลาร์ สำหรับ  $NaCl$  เพื่อให้เกิดการตกตะกอน (Figure 32a) จากการทดลองนี้เมื่อพิจารณาวาเลนซ์ และไอออนที่มีประจุตรงข้าม (counter ion) ของโลหะ พบว่า เหมือนกัน แต่ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนต่างกัน เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของโลหะประจุบวก พบว่า  $K^+$  (39.10) มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า  $Na^+$  (22.99) ซึ่งอาจส่งผลต่อกิจกรรมการตกตะกอน โดยโลหะที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าจะส่งผลให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนที่ดีกว่าโลหะที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย นอกจากนี้อาจมีผลมาจากค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity : EN) ของแต่ละโลหะด้วยเช่นกัน ซึ่งพบว่า  $K^+$  มีค่า EN เท่ากับ 0.8 น้อยกว่า  $Na^+$  (0.9) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการดึงดูดอิเล็กตรอนของอะตอมคู่ที่เกิดพันธะที่จะรวมกันเป็นโมเลกุล จากค่านี้ชี้ให้เห็นว่า  $Na^+$  มีแรงดึงดูดกับ  $Cl^-$  ได้ดีกว่า  $K^+$  ดังนั้นเมื่อเติมลงในปฏิกิริยาการตกตะกอน  $Na^+$  จึงเข้าจับกับอนุภาคดินขาวได้น้อยกว่า  $K^+$  เนื่องจากยังมีบางโมเลกุลของ  $Na^+$  ที่ยังจับกับ  $Cl^-$  อยู่ ส่วนการเติมแคท

ไอออนประจุสองบวกช่วยส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนได้ดีกว่าแคทไอออนประจุหนึ่งบวก จาก Figure 32b แสดงผลของชนิดและความเข้มข้นของแคทไอออนประจุสองบวกที่มีต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ SC-S พบว่า เมื่อพิจารณากิจกรรมการตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแคทไอออน 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า  $\text{CuCl}_2$  ช่วยส่งเสริมการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด รองลงมาคือ  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  และ  $\text{MgSO}_4$  ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ พบว่าปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพคือ ชนิดของ counter ion และน้ำหนักรีดิวซ์ของไอออน เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดของ counter ion พบว่าแคทไอออนที่มีน้ำหนักรีดิวซ์สูงจะช่วยส่งเสริมการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนได้ดีกว่าน้ำหนักรีดิวซ์ต่ำ โดย  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  และ  $\text{MgCl}_2$  ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 2.63, 2.51 และ 2.09 ตามลำดับ โดยโลหะแคทไอออนแต่ละชนิดมีน้ำหนักรีดิวซ์เท่ากับ 63.55, 40.08 และ 24.30 ตามลำดับ สำหรับ  $\text{FeSO}_4$  และ  $\text{MgSO}_4$  ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 2.42 และ 1.73 ตามลำดับ โดยโลหะแต่ละชนิดมีน้ำหนักรีดิวซ์เท่ากับ 55.84 และ 24.30 ตามลำดับ ซึ่งโลหะที่มีน้ำหนักรีดิวซ์สูงกว่าจะช่วยให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนสูงกว่าโลหะที่มีน้ำหนักรีดิวซ์น้อยกว่าเช่นเดียวกับกรณีศึกษาในแคทไอออนประจุหนึ่งบวก และเมื่อเปรียบเทียบค่า EN ของโลหะแต่ละชนิดพบว่า Cu, Ca, Mg และ Fe มีค่า EN เท่ากับ 1.9, 1.0, 1.2 และ 1.8 ซึ่งให้ผลไม่สัมพันธ์กับกิจกรรมการตกตะกอน จากผลตรงนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อแคทไอออนมีประจุหรือค่า valency เพิ่มขึ้น ค่า EN จะมีผลต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนน้อยลง โดยปัจจัยจะขึ้นกับน้ำหนักรีดิวซ์และชนิดของ counter ion มากกว่า แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคทไอออนแต่ละชนิดสูงกว่านี้ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  และ  $\text{MgSO}_4$  สำหรับการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนคือ 60, 20, 100 และ 40 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนตามลำดับดังนี้ 2.88, 2.55, 2.96 และ 2.90 แต่สำหรับ  $\text{CuCl}_2$  พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่า 10 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมการตกตะกอนกลับลดลง โดยกิจกรรมเกิดขึ้นสูงสุด (2.96) เมื่อเติม  $\text{MgCl}_2$  โดยต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 100 มิลลิโมลาร์ สำหรับกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพโดยการเติมแคทไอออนประจุสามบวก พบว่า ช่วยส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับประจุสองบวกกับประจุหนึ่งบวก พบว่า  $\text{Fe}^{3+}$  เกิดกิจกรรมการตกตะกอนสูงกว่า  $\text{Al}^{3+}$  ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.20 และ 2.74 ตามลำดับ โดย  $\text{Fe}^{3+}$  และ  $\text{Al}^{3+}$  ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนได้ดีที่สุดเมื่อเติมที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 1 มิลลิโมลาร์ เมื่อพิจารณาน้ำหนักรีดิวซ์พบว่า  $\text{Fe}^{3+}$  (55.84) มีน้ำหนักรีดิวซ์สูงกว่า  $\text{Al}^{3+}$  (26.98) ตามลำดับ ซึ่งโลหะที่มีน้ำหนักรีดิวซ์สูงกว่าจะช่วยให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนสูงกว่าโลหะที่มีน้ำหนักรีดิวซ์น้อยกว่าเช่นเดียวกับกรณีศึกษาในแคทไอออนประจุหนึ่งบวกและสองบวก และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักรีดิวซ์ของโลหะหนักกับกิจกรรมการตกตะกอนระหว่างทั้ง 3

กลุ่ม พบว่า กิจกรรมการตกตะกอนจะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของสารแบบแปรผันตรง โดยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่าจะช่วยส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอนที่ดีกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย แต่เมื่อพิจารณาค่า EN ของโลหะหนักพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการตกตะกอน โดย  $Fe^{3+}$  มีค่า EN เท่ากับ 1.8 ซึ่งมากกว่า  $Al^{3+}$  (1.5) แสดงว่าในแคทไอออนประจุสามบวก ค่า EN ไม่มีผลต่อการเกิดการตกตะกอนเช่นเดียวกับแคทไอออนประจุสองบวก และกิจกรรมการตกตะกอนจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคทไอออนเพิ่มขึ้นจากนี้ (Figure 32c) อาจเนื่องมาจากเมื่อมีการเติมแคทไอออนลงในปฏิกิริยามากเกินไป อาจทำให้แคทไอออนที่เหลือจากการจับกับประจุบนผิวอนุภาคดินขาวแล้ว มาจับกับ พอลิเมอร์ชีวภาพที่ตำแหน่งประจุลบของหมู่คาร์บอกซิล ( $COO^-$ ) ด้วย ทำให้ประจุรอบๆอนุภาคดินขาว และพอลิเมอร์มีประจุรวมเป็นชนิดเดียวกัน มีผลทำให้การจับกันได้ไม่ดี ส่งผลให้กิจกรรมการตกตะกอนลดลงด้วย

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าผลของการเติมแคทไอออนเพื่อช่วยส่งเสริมกิจกรรมการตกตะกอนให้เกิดขึ้นได้สูงขึ้นกับทั้งสองปัจจัยคือความเข้มข้นและจำนวนประจุ (valency) ของไอออน (Watanabe *et al.*, 1999) อีกทั้งยังมีปัจจัยอื่นคือ ขนาดน้ำหนักโมเลกุล และชนิดของ counter ion รวมด้วย รวมถึงค่าวาเลนซ์ (valency) ของโลหะแต่ละชนิดด้วย ซึ่งค่านี้แสดงถึงจำนวนอิเล็กตรอนที่รับเข้ามาเพื่อทำให้เกิดความเสถียรภาพ ถ้าไอออนมีวาเลนซ์สูงกว่า (กลุ่มแคทไอออนประจุสามบวก) จะช่วยปรับสภาพของประจุได้ดีกว่าไอออนที่มีวาเลนซ์ต่ำ (กลุ่มแคทไอออนประจุหนึ่งบวก)

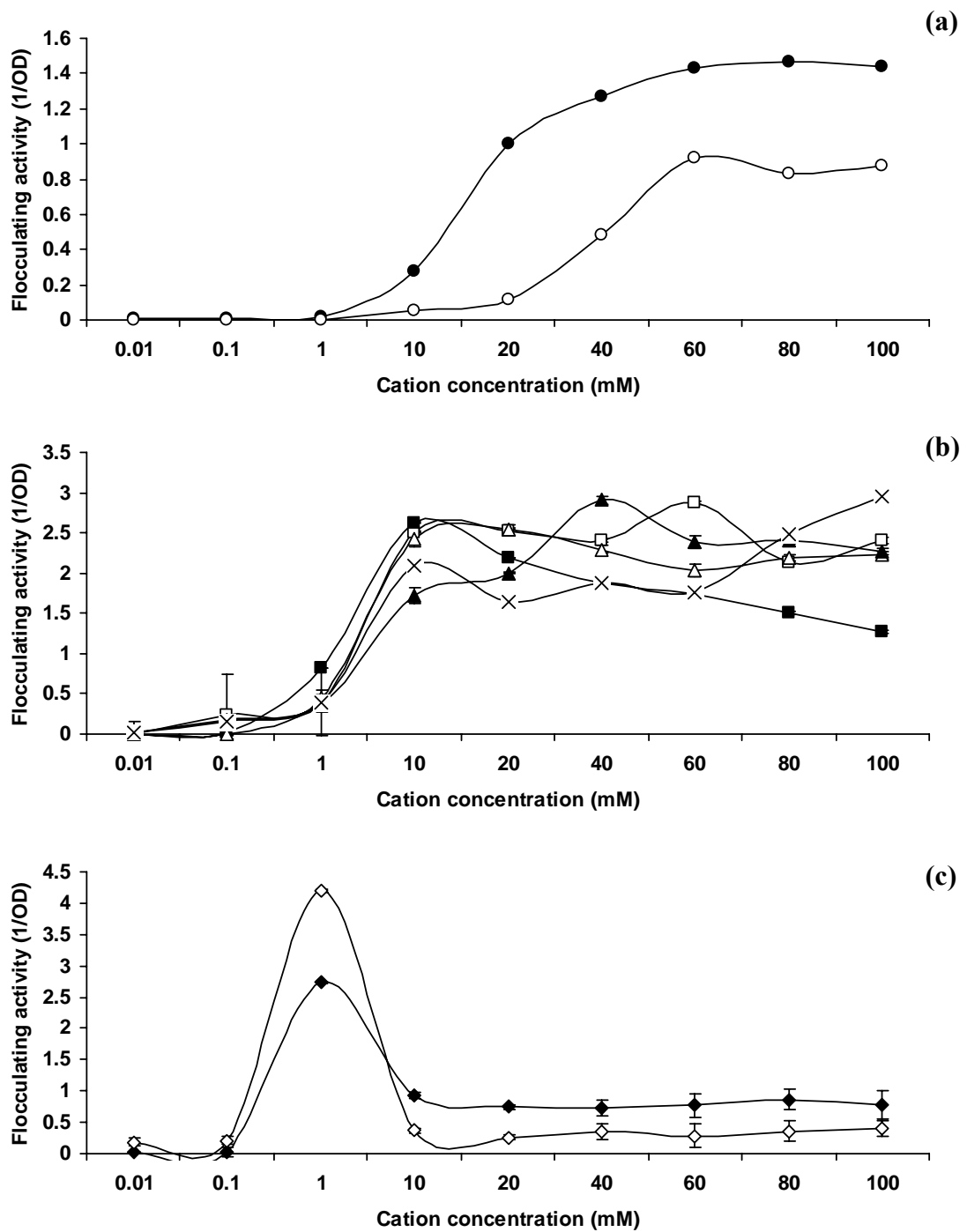


Figure 32. Effect of monovalent (a), divalent (b) and trivalent (c) cation concentrations on the flocculating activity of biopolymer SC-S. The flocculating activity was carried out using kaolin clay suspension with the addition of various cations at pH 7.0. Symbols; KCl (●), NaCl (○), CaCl<sub>2</sub> (□), CuCl<sub>2</sub> (■), FeSO<sub>4</sub> (△), MgSO<sub>4</sub> (▲), MgCl<sub>2</sub> (×), AlCl<sub>3</sub> (◆) and FeCl<sub>3</sub> (◇)

### 8.3 ผลของพีเอช

ค่าพีเอชเป็นปัจจัยที่สำคัญของการเกิดปฏิกิริยาและมีอิทธิพลต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอน จากการทดลองกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ SC-S 2 มีลิกนด์ต่อลิตร โดยเติมแคทไอออน (cation) ชนิดและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (1 mM FeCl<sub>3</sub>) ร่วมกับการปรับพีเอชที่ค่าต่างๆ (พีเอช 2-10) พบว่า พอลิเมอร์มีค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงที่สุดในสภาวะพีเอชที่เป็นกรดเล็กน้อย (พีเอช 5-6) โดยพีเอชที่เหมาะสมที่สุดคือ พีเอช 6 โดยมีค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ  $5.217 \pm 0.001$  และกิจกรรมการตกตะกอนเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นในช่วงพีเอช 4-6 และลดลงที่พีเอชสูงกว่า 6 และต่ำกว่า 4 (Figure 33) ซึ่งเป็นผลจากการที่เมื่อในสภาวะที่เป็นกรดสูงจะมีประจุบวก ( $H^+$ ) อยู่ในปริมาณสูง ดังนั้นเมื่อระดับพีเอชสูงขึ้น (ในช่วงพีเอช 4-6) ซึ่งเป็นการลดประจุบวกและเข้าไปปรับสภาวะของการตกตะกอนให้มีความเป็นกลางมากขึ้น และที่ระดับพีเอชเป็นด่างจะมีประจุลบจากหมู่ไฮดรอกซิล ( $OH^-$ ) เพิ่มขึ้น ซึ่งประจุลบจะเข้าไปแย่งจับกับประจุบวกของโลหะหนักแคทไอออน ทำให้พอลิเมอร์ไม่สามารถเข้าไปจับได้ เป็นผลให้กิจกรรมการตกตะกอนลดลง โดย Aspinall (1982 อ้างโดย Prasertsan *et al.*, 2006) กล่าวว่า การที่กิจกรรมการตกตะกอนลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชสูง อาจเนื่องมาจากไอออน  $OH^-$  ที่ไปรบกวนการเกิดฟลอคระหว่างพอลิเมอร์ชีวภาพและอนุภาคดินขาวที่มีโลหะแคทไอออนเป็นตัวกลางเชื่อม และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดสูงการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะพันธะ glycosidic ในสายพอลิเมอร์ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆและเกิดการเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลในสายพอลิเมอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์จาก *E. cloacae* WD7 ให้กิจกรรมการตกตะกอนสูงที่สุดที่พีเอช 6.0 (Prasertsan *et al.*, 2006) เห็นได้ว่าผลของพีเอชต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์จาก *E. cloacae* WD7 มีสภาวะที่ใกล้เคียงกับพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าส้ม ส่วนกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิแซคคาไรด์จาก *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 มีกิจกรรมการตกตะกอนดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกลาง (พีเอช 5-8) และมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนดีที่สุดในพีเอช 7.0 แต่เมื่อพีเอชมากกว่า 8.0 หรือต่ำกว่า 6 กิจกรรมการตกตะกอนลดลง (Li *et al.*, 2008) แต่กิจกรรมการตกตะกอนของเพคตินในสารละลายดินขาวให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกรด โดยที่พีเอชเท่ากับ 3 ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุด (Yokoi *et al.*, 2002) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การตกตะกอนเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนความหนาแน่นของประจุ และการเติมแคทไอออนที่พีเอชค่าเฉพาะอาจมีผลต่อ neutralization of zeta potential ซึ่งเป็นค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิว (Shih *et al.*, 2001) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าระดับพีเอชมีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอน โดยที่ระดับพีเอชที่ให้กิจกรรมการตกตะกอนดีที่สุ่มขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์

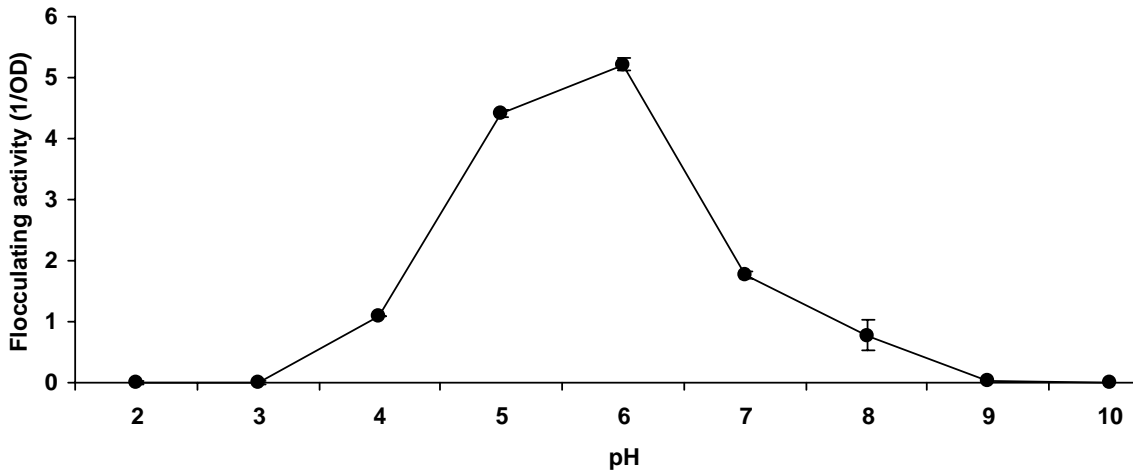


Figure 33. Effect of pH (2.0 to 10.0) on the flocculating activity using biopolymer SC-S (5 mg/L) and 1 mM FeCl<sub>3</sub>

### 9. สภาพที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพโดยใช้ Response surface methodology (RSM)

หลักการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology: RSM) เป็นเทคนิคทางสถิติที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง สร้างโมเดล ประเมินผลของปัจจัย และหาสถานะที่เหมาะสมของปัจจัยที่ต้องการ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกลุ่มการทดลองที่จะนำไปสู่การประเมินผลของความสัมพันธ์ที่มีอยู่ระหว่างกลุ่มปัจจัยการทดลองที่ควบคุมและการตอบสนองที่วัดได้ โดยกำหนดไว้ด้วยมาตรฐานที่คัดเลือกได้ ความรู้และความเข้าใจเบื้องต้นของตัวแปรอิสระในกระบวนการทดลองเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการได้มาซึ่งแบบจำลองที่สามารถนำไปปฏิบัติได้จริงและมีความสมเหตุสมผล (Prasanthi *et al.*, 2008) จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งป่าลัม (SC-S) ในสารละลายดินขาว โดยมีปัจจัยที่ใช้ศึกษาประกอบด้วย 3 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ชีวภาพ, ชนิดและความเข้มข้นของไอออน และค่าพีเอช ทำการทดลองแบบสุ่มโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการกำหนดลำดับการทดลอง ผลดังแสดงใน Table 22 จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์การถดถอยของพื้นที่ผลตอบสนอง นำผลที่ได้จากตารางไปวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยใช้แบบจำลองการถดถอยของพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อนำไปใช้ทำนายค่ากิจกรรมการตกตะกอนซึ่งจะได้ค่าประมาณของสัมประสิทธิ์ (Coefficient estimate) ของปัจจัยและอันตรกิริยาระหว่างปัจจัย (Interaction) ทั้งหมด แล้วนำไปใช้ทำนายค่าของผลตอบสนองเพื่อหาค่าของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด พบว่า ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่

ได้อยู่ในช่วง 1.02 – 7.87 (Table 22) โดยได้ค่ากิจกรรมต่ำสุด ( $0.80 \pm 0.03$ ) เมื่อใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และ  $\text{FeCl}_3$  เท่ากับ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร, 1.40 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และปรับพีเอชเป็น 8.02 (Table 22, trial 14) จะเกิดกิจกรรมสูงสุดเมื่อมีค่าที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์,  $\text{FeCl}_3$  และพีเอช เท่ากับ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร, 1.40 มิลลิโมลาร์ และพีเอช 5.50 ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด  $7.87 \pm 0.00$  (1/OD) (Table 22, trial 15) ซึ่งสูงกว่าจากการทดลองแต่ละปัจจัยในข้อ 8) โดยพบว่ากิจกรรมการตกตะกอนเกิดขึ้นได้สูงเมื่อมีค่าที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  1.00 มิลลิโมลาร์ และพีเอชเท่ากับ 6.00 ได้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ  $5.22 \pm 0.00$

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติใน Table 23 ซึ่งเป็นตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว เป็นสถิติที่ทดสอบว่า R-square มีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยหากค่า F มีนัยสำคัญทางสถิติก็แสดงว่าความแปรปรวนของตัวแปรตามอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระ จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาจากค่า Sig.(Prob>F) (ถ้า  $\text{Prob}>F \leq 0.05$  แสดงว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อยหนึ่งตัวที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญ) พบว่า ปัจจัยที่มีผลร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า  $\text{Prob}>F < 0.05$  นั้นมี 2 ปัจจัย คือ พอลิเมอร์กับพีเอช และ  $\text{FeCl}_3$  กับพีเอช ซึ่งจะเห็นว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลร่วมกันกับปัจจัยอื่น เพราะว่ามีค่า  $\text{Prob}>F < 0.05$  ในขณะที่ปัจจัยระหว่างพอลิเมอร์กับ  $\text{FeCl}_3$  ไม่มีผลร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $\text{Prob}>F > 0.05$ ) โดยสมการความถดถอยที่คาดไว้สำหรับผลการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนสามารถแสดงดังสมการ

$$Y_1 = 7.87 + (0.10X_1) - (0.32X_2) + (0.026X_3) - (0.38X_1^2) - (2.06X_2^2) - (2.40X_3^2) - (0.079X_1X_2) - (0.18X_1X_3) + (0.22X_2X_3)$$

โดยที่  $X_1$  = Polymer concentration (mg/L)

$X_2$  =  $\text{FeCl}_3$  concentration (mM)

$X_3$  = pH

$Y_1$  = Flocculating activity

และผลของแบบจำลองเหมาะสมของพื้นผิวผลตอบสนองกำลังสองในรูปของการวิเคราะห์ตัวแปร (ANOVA) แสดงใน Table 24 โดยรูปแบบจำลองที่เหมาะสมสามารถตรวจสอบได้จากค่าดังต่อไปนี้คือ ค่า  $R^2$  (0.9976) ซึ่งค่า  $R^2$  คือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรืออำนาจในการทำนาย หมายถึง สัดส่วนของความแปรปรวนในตัวแปรตามที่อธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระ ถ้าค่า  $R^2$  เข้าใกล้ 1 แสดงว่า เปอร์เซ็นต์ที่ X สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของ Y มีค่ามาก ถ้าค่า  $R^2$  มีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าเปอร์เซ็นต์ที่ X สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของ Y มีค่าน้อย จากตัวแปรอิสระ

(polymer concentration, FeCl<sub>3</sub> concentration และ pH) สามารถอธิบายตัวแปรตาม (flocculating activity) ได้ 99.76 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, C.V.) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบการกระจายข้อมูลตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไปที่มีหน่วยการวัด หรือมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ถ้าค่ามากแสดงว่าข้อมูลมีการกระจายมาก ถ้าค่าน้อยแสดงว่าข้อมูลมีการกระจายน้อย จากแบบจำลองมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 3.96% และค่า Adjusted. R<sup>2</sup> (0.9954) ซึ่งเป็นค่าการประมาณค่าใหม่ว่า ถ้านำสมการนี้ไปใช้อ้างอิงกับกลุ่มตัวอย่างอื่นค่าอำนาจจำแนกจะลดลงเป็น 99.54 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า Adeq. precision เป็นค่าที่บอกถึงอัตราส่วนของสัญญาณรบกวนในแบบจำลอง โดยค่านี้ควรมีค่ามากกว่า 4 จึงเป็นที่ยอมรับได้ (Baijaj and Singhal, 2009) ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีค่าเท่ากับ 53.68 ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ และค่า lack of fit ที่ได้ต้องไม่มีนัยสำคัญ Prob>F>0.05 (0.32)

ลักษณะพิเศษของ RSM อีกอย่างคือ การใช้กราฟ response surface plot และการพยากรณ์ค่าที่ได้เพื่อศึกษาหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยร่วมกันระหว่างตัวแปร ซึ่งจะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม หรือตัวแปรตอบสนอง (response variable) ที่มีค่า Prob>F<=0.05 ทั้งหมด 2 กราฟ แสดงค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้กับตัวแปรอิสระทั้งสองตัว คือ พอลิเมอร์ กับ พีเอช (Figure 34a) และ FeCl<sub>3</sub> กับ พีเอช (Figure 34b) จะเห็นว่าภาพของผลตอบสนองมีลักษณะเป็นพื้นผิว จึงมักเรียกรูปที่แสดงค่าของผลตอบสนองที่เปลี่ยนไปตามค่าของตัวแปรอิสระว่า พื้นผิวผลตอบสนอง (response surface) สำหรับจุดศูนย์กลาง (composition of center points) ของ contour plot พบว่า ค่าที่พยากรณ์ได้ของกิจกรรมการตกตะกอนที่ความเข้มข้นของตัวแปรที่เหมาะสมในปฏิกิริยา คือ มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ FeCl<sub>3</sub> 1.40 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 5.50 ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงที่สุด (7.42 1/OD)



Table 22. The central composite design (CCD) matrix defining biopolymer concentrations, FeCl<sub>3</sub> concentrations and pH and results on flocculating activity where X<sub>1</sub> = biopolymer concentration, X<sub>2</sub> = FeCl<sub>3</sub> and X<sub>3</sub> = pH

Trials	Parameters			Flocculating activity	
	X <sub>1</sub> (mg/L)	X <sub>2</sub> (mM)	X <sub>3</sub>	Predict	Experiment
1	2.00	0.80	4.00	3.17	3.1±0.00
2	8.00	0.80	4.00	3.89	3.85±0.06
3	2.00	2.00	4.00	2.26	2.1±0.00
4	8.00	2.00	4.00	2.66	2.7±0.05
5	2.00	0.80	7.00	3.15	3.2±0.00
6	8.00	0.80	7.00	3.15	3.4±0.00
7	2.00	2.00	7.00	3.10	3.23±0.01
8	8.00	2.00	7.00	2.79	2.95±0.04
9	0 (-0.05)	1.40	5.50	6.61	6.68±0.00
10	10.05	1.40	5.50	6.95	6.75±0.01
11	5.00	0.39	5.50	2.58	2.5±0.06
12	5.00	2.41	5.50	1.51	1.45±0.00
13	5.00	1.40	2.98	1.02	1.2±0.03
14	5.00	1.40	8.02	1.11	0.8±0.09
15	5.00	1.40	5.50	7.87	7.87±0.09

<sup>a</sup>Results are mean ± SD of at least three determinations

Table 23. Quadratic model coefficient estimated by multiples linear regression (significance of regression coefficients)

Independent variables <sup>a</sup>	Coefficient estimate	Standard error	Degrees of freedom	Prob > $F^b$
Intercept	7.87	0.074	1	-
$X_1$	0.10	0.049	1	0.0640
$X_2$	-0.32	0.049	1	<0.0001
$X_3$	0.026	0.049	1	0.6036
$X_1^2$	-0.38	0.048	1	<0.0001
$X_2^2$	-2.06	0.048	1	<0.0001
$X_3^2$	-2.40	0.048	1	<0.0001
$X_1X_2$	-0.079	0.064	1	0.2450
$X_1X_3$	-0.18	0.064	1	0.0187
$X_2X_3$	0.22	0.064	1	0.0069

<sup>a</sup> $X_1$  = Polymer concentration (mg/L),  $X_2$  = FeCl<sub>3</sub>, (mM),  $X_3$  = pH

<sup>b</sup>p < 0.05 are significant,  $R^2 = 0.99$

Table 24. ANOVA for response surface quadratic model

Item	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	Probability > $F$
Model	133.81	9	14.87	457.18	< 0.0001
Residual	0.33	10	0.033	-	-
Lack of fit	0.32	5	0.065	474.92	< 0.0001
Pure error	$6.833 \times 10^{-4}$	5	$1.367 \times 10^{-4}$	-	-
Cor total	134.14	19			
Root MSE	0.18				
Dep. Mean	4.56				
C.V.	3.96				
PRESS	2.49				
R-square	0.9976				
Adj.R-square	0.9954				
Adeq Precision	53.682	Desire > 4			

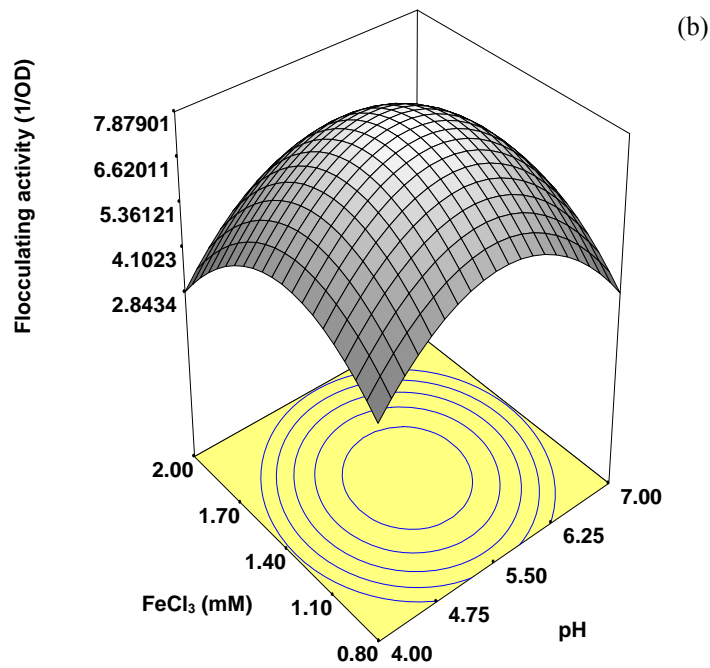
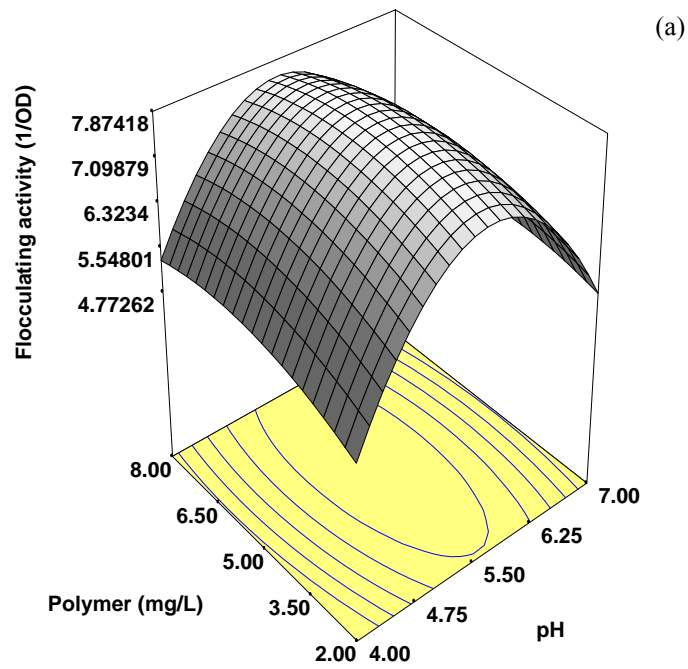


Figure 34. Response surface plot for flocculating activity of polymer from sterilizer condensate (SC-S) to determine the effect of polymer concentration (mg/L) and pH (a), and the effect of FeCl<sub>3</sub> concentration (mM) and pH (b)

### การทดลองเพื่อยืนยันผล

หลังจากได้ค่าปัจจัยที่เหมาะสมจากสมการการทำนายคือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  เท่ากับ 1.40 มิลลิโมลาร์ และค่าพีเอชเท่ากับ 5.50 แล้วนำค่าปัจจัยที่ได้ไปทำการทดลองหาค่ากิจกรรมการตกตะกอนเพื่อยืนยันผลการทดลอง ซึ่งทำการทดลองจำนวน 8 หน่วยทดลอง ได้ผลตาม Table 25 จากการทดลองเพื่อยืนยันผลจะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมการทดลองอยู่ในช่วง 5.12 ถึง 7.28 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าทำนายคือ 5.18 ถึง 7.39 โดยสถานะที่เหมาะสมของปัจจัยของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  และค่าพีเอช เท่ากับ 2.83, 1.47 และ 5.14 ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ 7.28 1/OD

Table 25. Confirmation experimental design

Trial	Parameters			Flocculating activity (1/OD)		% error
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Predicted values	Experimental values	
1.	2.13	1.16	5.84	7.10	6.77	4.65
2.	6.68	1.57	4.59	6.65	6.62	0.45
3.	6.50	1.61	5.25	7.39	6.93	6.22
4.	6.16	1.72	4.87	6.62	5.89	11.03
6.	5.11	1.06	6.90	5.18	5.16	0.39
8.	2.83	1.47	5.14	7.35	7.28	0.95
9.	2.70	1.16	5.67	7.31	7.26	0.68
10.	7.70	1.96	5.00	5.22	5.12	1.92

$X_1$  = Polymer concentration (mg/L)

$X_2$  =  $\text{FeCl}_3$  concentration (mM)

$X_3$  = pH

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองก่อนศึกษาสถานะที่เหมาะสม และสถานะที่เหมาะสม (Table 26) พบว่า ก่อนศึกษาสถานะที่เหมาะสมโดยใช้ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  1.00 มิลลิโมลาร์ และพีเอชเท่ากับ 6.00 ได้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ  $5.22 \pm 0.00$  1/OD ตามลำดับ แต่เมื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  1.40 มิลลิโมลาร์ และพีเอชเท่ากับ

5.50 ได้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ  $7.45 \pm 0.09$  1/OD สำหรับจุดศูนย์กลาง (composition of center points) พบว่า ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ  $\text{FeCl}_3$  1.40 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 5.50 ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ 7.42 1/OD และเมื่อทำการทดลองยืนยันผลอีกครั้งโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 2.83 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{FeCl}_3$  1.47 มิลลิโมลาร์ และพีเอชเท่ากับ 5.14 ได้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ  $7.28 \pm 0.09$  1/OD

Table 26. Optimization for flocculating activity by using the polymer from sterilizer condensate (SC-S) as flocculant

No	Parameters			Flocculating activity (1/OD)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1 <sup>a</sup>	5	40 ( $\text{CaCl}_2$ )	7.0	2.20
2 <sup>b</sup>	2	1 ( $\text{FeCl}_3$ )	6.0	5.22
3 <sup>c</sup>	5	1.40 ( $\text{FeCl}_3$ )	5.5	7.42
4 <sup>d</sup>	5	1.40 ( $\text{FeCl}_3$ )	5.5	7.45
5 <sup>e</sup>	5	1.40 ( $\text{FeCl}_3$ )	5.5	7.45
6 <sup>f</sup>	2.83	1.47 ( $\text{FeCl}_3$ )	5.14	7.28

$X_1$  = polymer concentration, (mg/L)

$X_2$  = Cation concentration, (mM)

$X_3$  = pH

<sup>a</sup> The values before optimization.

<sup>b</sup> The optimization values derived from conventional method

<sup>c</sup> The composition of center points.

<sup>d</sup> The optimized values derived from RSM regression and flocculating activity in this study.

<sup>e</sup> The predicted optimum values and predicted maximum flocculating activity derived from RSM regression in this study

<sup>f</sup> The optimized values derived from confirmation of RSM optimization and flocculating activity in this study.

จากที่เคยมีรายงานมา พบว่า ความเข้มข้นของแคทไอออนกับพีเอชเป็นปัจจัยร่วมกันที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอน (Bajaj and Singhal, 2009; Shih *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 1995) จากการศึกษาโดยใช้ RSM นี้ช่วยยืนยันผลการทดลองว่าความเข้มข้นของแคทไอออนและพีเอช กับความเข้มข้นของแคทไอออนและความเข้มข้นของสารตกตะกอนชีวภาพมีปฏิกริยาร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญและมีผลซึ่งทำงานร่วมต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอน

ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้จากการทดลองนี้ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมการตกตะกอนของสารตกตะกอนในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์เหมือนกันและจากกลุ่ม Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) (PGA) จากการศึกษาของ Prasertsan และคณะ (2006) พบว่า สารตกตะกอนชีวภาพชนิดพอลิแซคคาไรด์จาก *Enterobacter cloacae* WD7 โดยใช้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยดินขาวสูงที่สุด ( $105 \text{ 1/OD}$ ) เมื่อใช้  $\text{CaCl}_2$  ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และระดับพีเอชที่เหมาะสมในการการตกตะกอนอยู่ในช่วง 2-8 และจากการศึกษาของ Yokoi และคณะ (1995) ได้ศึกษากิจกรรมการตกตะกอนโดยใช้ PGA 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ  $\text{Ca}^+$  พบว่าได้กิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด  $33.0 \text{ 1/OD}$  นอกจากนี้ กิจกรรมการตกตะกอนของ PGA ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* DYU1 เท่ากับ  $13.5 \text{ 1/O}$  เมื่อใช้พอลิเมอร์ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (Wu and Ye, 2007) และ PGA จาก *Bacillus* sp. มีกิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด  $30.32 \text{ 1/OD}$  เมื่อใช้ PGA 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ  $\text{Ca}^{2+}$  80 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.5 (Bajaj and Singhal, 2009) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากที่รายงานมาพบว่า พอลิเมอร์มักมีขนาดใหญ่โดยอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^6$  คาลตัน เนื่องจากเหตุผลสำคัญต่อการเกิดการตกตะกอนได้สูงคือ สารตกตะกอนต้องมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูง โดยน้ำหนักโมเลกุลของสารตกตะกอนจะสัมพันธ์กับความยาวของสายพอลิเมอร์ และเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกริยาการตกตะกอน สารตกตะกอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่มักมีสายยาวและมี sufficient number ของ free functional groups ซึ่งสามารถเกิดการยึดเกาะร่วมกันระหว่างอนุภาคแขวนลอยได้ ดังนั้น จึงทำให้ในปฏิกริยาการตกตะกอนมีขนาดของฟล็อกที่ใหญ่ (Shih *et al.*, 2001) เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 1,223 คาลตัน ซึ่งให้เห็นว่าการเกิดกิจกรรมการตกตะกอนครั้งนี้ น้ำหนักโมเลกุลของสารตกตะกอนไม่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการตกตะกอน แต่กิจกรรมการตกตะกอนอาจเกิดขึ้นโดยอาศัยประจุบนสายพอลิเมอร์ และการที่พอลิเมอร์ชีวภาพมีโมเลกุลขนาดเล็กอาจมีส่วนช่วยในการทำให้ประจุของแคทไอออนเข้าทำปฏิกริยากับสารละลายดินขาวได้ดีขึ้น

## บทที่ 4

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

#### 1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม

ผลของอัตราส่วนน้ำนิ่งป่าลุ่มต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 5 จะให้ผลผลิตเท่ากับ 12.05 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์ชีวภาพจากน้ำนิ่งป่าลุ่มคือที่ อุณหภูมิห้อง

#### 2. การแยกขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่ม

แยกขนาดพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าลุ่มโดยใช้เทคนิค gel filtration chromatography ใช้คอลัมน์ชนิด Sephadex G-25 medium ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น พบว่า ได้กลุ่มพอลิเมอร์ที่มี น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (MP) เท่ากับ 2525 และ 1223 ดาลตัน โดยแยกได้ yield เท่ากับ 65.31% และ 12.82% ตามลำดับ ของพอลิเมอร์ทั้งหมดที่แยกผ่านคอลัมน์ โดยแทนสัญลักษณ์ของพอลิเมอร์จาก น้ำนิ่งป่าลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก และโมเลกุลใหญ่ด้วย SC-S และ SC-L ตามลำดับ

#### 3. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Cordyceps dipterrigena* BCC2073 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ทั้ง 6 สูตร พบว่า เชื้อผลิตพอลิเมอร์สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDB เท่ากับ 2.94 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.281 กรัมต่อลิตรต่อวัน และให้ผลผลิตที่ ได้สูงสุดต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละอาหารเท่ากับ 0.288 กรัมต่อกรัม

#### 4. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อราในน้ำนิ่งป่าลุ่ม

เมื่อเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวในน้ำนิ่งป่าลุ่มเจือจาง (มีค่าซีไอดีและไนโตรเจน เท่ากับ 40,000 และ 267 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ปรับพีเอชเริ่มต้นจาก 5.05 เท่ากับ 6.2 พบว่า เชื้อให้ปริมาณมวลชีวภาพมากที่สุด (23.43 กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน และสามารถผลิต พอลิเมอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 6.53 กรัมต่อลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน หรือคิดเป็น ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้ต่อกรัมเซลล์เท่ากับ 0.68 กรัมต่อกรัม และค่าอัตราการผลิตพอลิเมอร์

เท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อวัน และสามารถลดค่าซีไอดีและของแข็งทั้งหมดของน้ำทิ้งได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการบำบัดเป็นเวลา 21 วัน (70.70 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

## 5. ลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์จากน้ำนิ่งป่าล้มและจากเชื้อราที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน

พอลิเมอร์ SC-S, SC-L และพอลิเมอร์จาก *C. dipterrigena* BCC2073 ที่เลี้ยงในน้ำนิ่งป่าล้ม (CD) สามารถละลายได้ดีในน้ำและ DMSO แต่ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขี้น้อยกว่า DMSO เมื่อศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี FT-IR พบว่ามีหมู่ไฮดรอกซิล อีเทอร์ คาร์บอนิล และแอลเคน ซึ่งเป็นหมู่ของโมเลกุลน้ำตาล และมีแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการยึดของพันธะ C<sub>1</sub>-H ( $\beta$ -glycosidic linkage) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1,223, 6,431 และ 20,064 คาลตันตามลำดับ และพอลิเมอร์ทั้งสามชนิดมีองค์ประกอบดังแสดงใน Table 27

Table 27 Composition of the partially purified biopolymer

Quantitative tests (mg/g)	Analyzed Item	SC-S	SC-L	CD
1. Phenol sulphuric acid reaction	Total sugar	241.29	231.70	205.33
2. DNS	Reducing sugar	101.78	100.22	66.89
3. L-cysteine hydrochloride assay				
	Hexose content	62.00	86.61	62.61
	Pentose content	55.31	77.26	56.78
4. Carbazole-sulphuric reaction	Glucuronic acid	3.70	17.86	14.18
5. Monosaccharide composition				
	Glucose	41.29	5.86	147.41
	Xylose	109.29	43.64	-
	Arabinose	26.14	7.75	120.68



## 6. คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

เมื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกในแง่ความสามารถในการทนต่อการย่อยโดยกรดและเอนไซม์ พบว่า พอลิเมอร์ชีวภาพทั้ง 3 ชนิด สามารถทนต่อการย่อยโดยกรดและเอนไซม์ได้ดี โดยพบว่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของพอลิเมอร์ชีวภาพสามารถเหลือไปยังลำไส้ใหญ่ได้ ดังนั้นจึงถือได้ว่าพอลิเมอร์ชีวภาพดังกล่าวมีแนวโน้มในการที่จะเป็นพรีไบโอติกที่ดี และเมื่อทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพอลิเมอร์ชีวภาพที่คัดเลือกได้ต่อแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* พบว่า เชื้อทั้งสองไม่สามารถนำพอลิเมอร์ชีวภาพไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้

## 7. คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอนชีวภาพและปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพในสารละลายดินขาว

พอลิเมอร์จากน้ำนิ่งปาล์มชนิด SC-S มีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนได้ในสารละลายดินขาว (kaolin) โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอน คือ พีเอช 6.0 มีการเติมแคทไอออนชนิด  $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ ) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และใช้พอลิเมอร์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 5.22 (1/OD)

## 8. สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ชีวภาพโดยใช้ Response surface methodology (RSM)

สภาวะที่เหมาะสมต่อการกิจกรรมการตกตะกอนโดยใช้ RSM คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $FeCl_3$  เท่ากับ 1.40 มิลลิโมลาร์ และค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 โดยให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุด 7.45 (1/OD)

## ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานวิจัยเกี่ยวกับพอลิเมอร์ชีวภาพมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ควรมีการศึกษาถึงลักษณะและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่แยกได้จากน้ำนิ่งปาล์มที่อัตราส่วนการตกตะกอนอื่นๆ ด้วย
2. ควรมีการศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bifidobacteria* ด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2552. ปาล์มน้ำมัน : พืชพลังงานหรือพืชอาหาร (ออนไลน์) สืบค้นจาก : [http://www.trf.or.th/tips/x.asp?Art\\_ID=185](http://www.trf.or.th/tips/x.asp?Art_ID=185), ระบบตลาดปาล์มน้ำมัน : สุราษฎร์ธานี (ออนไลน์) สืบค้นจาก : [http://www.trf.or.th/tips/x.asp?Art\\_ID=186](http://www.trf.or.th/tips/x.asp?Art_ID=186) (16 พฤศจิกายน 2552)
- ชัยวัฒน์ เจนวนิชย์. 2527. บทนำ: แนวคิดพื้นฐานในโพลีเมอร์เชิงพาณิชย์. หน้า 1-80. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เต็มสุข แดงหอม, กฤษณา ปิวสาร, วงศ์ลี ทองดอนง้าว, สิริรัตน์ พานิช, จุฑาทิพย์ นิลคูหา และ ณรงค์ศักดิ์ เจริญศิริ. Department of Chemistry. Faculty of Science. Burapha University. 2004. แนวคิดพื้นฐานและเคมีพอลิเมอร์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : [http://www.sci.buu.ac.th/~chemistry/staff/thanida/Polymer\\_Chemistry/image\\_files/chapter1\\_2.html](http://www.sci.buu.ac.th/~chemistry/staff/thanida/Polymer_Chemistry/image_files/chapter1_2.html) (1 เมษายน 2553)
- นันทินา เชิญทอง. 2250. การคัดเลือก ลักษณะ และคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิรัญญา บุญดีน. 2550. การคัดเลือกโปรไบโอติกจากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากร และสหพัฒน์ บัรส์วีร์กษ. 2007. อะพอพโทซิส: วิธีและการตรวจวัด. J. Health Res. 21: 227-238.
- พิมพ์จิต ตามพวรรณ. 2536. เคมีอินทรีย์เบื้องต้น. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรพร, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงษ์กิตตกุล. 2533. กระบวนการใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งและคุณสมบัติของน้ำเสียของโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 12: 169-176.
- พูนสุข ประเสริฐสรพร. 2542. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 328.

- พูนสุข ประเสริฐสรพรพ์, อรัญ หันพงศักรัตติกุล และ โสภา จันทโสภา. 2544. เปรียบเทียบการกำจัดสีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีการทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. (ฉบับพิเศษ) 23: 807–819.
- ระพีพรรณ เดิมตันท์. 2547. องค์ประกอบและคุณสมบัติของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิทยา ปันสุวรรณ, จารุวรรณ ไผ่ทอง และปริศนา สิริอาษา. 2551. การตรวจหาองค์ประกอบของน้ำตาลในสารละลายเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการระเบิดเปลือกปอสาด้วยไอน้ำ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริพร หมาดหล้า. 2544. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภาวดี สุขะลา. 2550. คุณลักษณะและการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์จากเชื้อรา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- โสภารวรรณ รัตนพันธ์. 2547. การบำบัดและการกำจัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรัญ หันพงศักรัตติกุล, พูนสุข ประเสริฐสรพรพ์, กัลยา ศรีสุวรรณ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และ วีระศักดิ์ ทองลิ้มปี. 2537. การลดการสูญเสียไขมันในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.
- A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15<sup>th</sup> ed. The association of Official Analytical Chemists Inc. Virginia.
- Ahmad, A.L., Chong, M.F. and Bhatia, S. 2007. Mathematical modeling of multiple solutes system for reverse osmosis process in palm oil mill effluent (POME) treatment. Chem. Eng. J. 132: 183-193.
- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. Introductory Mycology. p. 632. John Wiley & Sons. New York.

- APHA, AWWA and WEF. 1998. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 18<sup>th</sup> ed. N.Y.: American public Health Association. Washington, D.C.
- Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanuki, M. and Tanka, R. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection by symbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 985-996.
- Atlas, R.M. 1997. Handbook of Microbiological Media. CRC Press. Boca Raton. FL.
- Ayed, L. and Hamdi, M. 2003. Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus platarum*. Process Biochem. 39: 59-65.
- Bajai, I.B. and Singhal, R.S. 2009. Flocculation properties of Poly ( $\gamma$ -Glutamic Acid) produced from *Bacillus subtilis* isolate. Food Bioprocess Technol. Doi: 10.1007/s11947-009-0186-y.
- Bandaiphet, C. and Prasertsan, P. 2006. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient,  $k_La$  in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7 Carbohyd. Polym. 66: 216–228.
- Blaschek, W., Kasbauer, J., Kraus, J. and Franz, G. 1992. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1→3), (1→4)- $\beta$ -D-glucans. Carbohydr. Res. 231: 293-307.
- Bohn, J.A. and BeMiller, J.N. 1995. (1,3)-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. Carbohydr. Polym. 28: 3-14.
- Bok, J.W., Lermer, L., Chilton, J. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. Phytochem. 51: 891-898.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V. and Sermanni, G.G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluent from an olive mill by a white-rot fungus. J. Biotechnol. 61: 209-218.
- Borel, C., Welti, D.H., Fernandez, I. and Colmenares, M. 1993. Didranin, an antimicrobial and 15-lipoxygenase inhibitor from the moss *Didranum scoporium*. J. Natural. Product. 56: 1071-1077.
- Cano, A. and Palet, C. 2007. Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOE-MS. J. Membr. Sci. 291: 96-105.

- Cha, S.H., Lim, J.S., Yoon, C.S., Koh, J.H, Chang, H.I. and Kim, S.W. 2007. Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. *Bioresour. Technol.* 98: 165-168.
- Chavalparit, O., Rulkens, W.H., Mol, A.P.J. and Khaodhair, S. 2006. Options for environmental sustainability of the crude palm oil industry in Thailand through enhancement of industrial ecosystems. *Environ.* 8: 271-287.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1986. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Washington DC. IRL Press.
- Cheah, C., Montgomery, M.E., Salom, S., Parker, B.L., Costa, S. and Skinner, M. 2004. Biological Control of Hemlock Woolly Adelgid. USDA For. Serv. FHTET-2004-04, Reardon, R. and Onken, B. (Tech. Coordinators): pp. 22.
- Cochran, T.W. and Vercellotti, J.K. 1978. Hexosamine biosynthesis and accumulation by fungi in liquid and solid media. *Carbohydr. Res.* 61: 529-543.
- Collins, E.A., Bares, J. and Billmeyer, F.W. 1973. *Experiments in Polymer Science*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Collins, L.A. and Franzblau, S.G. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1004-1009.
- Complex carbohydrate research center. The university of Georgia. 2007. Plant cell walls (online). Available : <http://www.ccrc.uga.edu/~mao/intro/outline.htm> (26 May 2010)
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerstrom, R., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K. 2002. *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 82: 781-789.
- Crittenden, R.G. and Playne, M.J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 353-361.
- Crognale, S., Federici, F. and Petruccioli, M. 2003.  $\beta$ -Glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters. *Biotechnol. Lett.* 25: 2013-2015.
- Cumming, J.H. and Englyst, H.N. 1987. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1243-1255.

- Cumming, J.H., Macfarlane, G.T. and Englyst, H.N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 415S-420S.
- D' Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V. and Sermanni-G., G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J. Biotechnol.* 61: 209-218.
- D' Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Mattia, E.D. and Sermanni, G.G. 1999. Characterization of immobilized laccase from *Lentinus edodes* and its use in olive mill wastewater treatment. *Process Biochem.* 34: 697-706.
- D' Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F. and Petruccioli, M. 2006. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour. Technol.* 97: 1828-1833.
- Dermlim, W., Prasertsan, P. and Doelle, H. 1999. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 698-703.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M. and Pereira, A.N. 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 92: 7-13.
- Dong, C.H. and Yao, Y.-J. 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture *J. App. Microbiol.* 99: 483-492.
- Fadil, K., Chahlaoui, A., Ouahbi, A., Zaid, A. and Borja, R. 2003. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 51: 37-41.
- Fasidi, I.O. and Olorunmaiye, K.S. 1994. Studies on the requirements for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer a Nigerian mushroom. *Food Chem.* 50: 397-401.
- Fook, L.J. and Gibson, G.R. 2002. *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbe. Ecol.* 39: 67-75.
- Forabosco, A., Bruno, G., Sparapano, L., Liut, G., Marino, D. and Delben, F. 2006. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*-I. Production and characterisation of the exopolysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 63: 535-544.
- Gao, J., Boa, H.Y., Xin, M.X., Liu, Y.X., Li, Q., and Zhang, Y.F. 2006. Characterization of bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus* sp. W31. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 7: 196-192.

- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Gibson, G.R. 2004a. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinic. Nutr. supplements* 1: 25-31.
- Gibson, G.R. 2004b. Prebiotics. *Best Practice Res. Clin. Gastroenterology* 18:287–298.
- Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. and Rudloff, S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *J. Nutr.* 130: 3014-3020.
- Gong, W.X., Wang, S.-G., Sun, X.-F., Liu, X.-W., Yue, Q.-Y. and Gao, B.-Y. 2008. Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 99: 4668–4674.
- Grimm, L.H., Kelly, S., Krull, R. and Hempel, D.C. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 375-384.
- Grootaert, C., Delcour, J.A., Courtin, C.M., Broekaert, W.F., Verstraete, W. and Van de Wiele, T. 2007. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 64-71.
- Ha, Y.W., Stack, R.J., Hespell, R.B., Gordon, S.H. and Bothast, R.J. 1991. Some chemical and physical properties of extracellular polysaccharides produced by *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2016-2020.
- Hartley, C.W.S. 1997. Oil Palm Selection and Breeding. *In the Oil Palm*. p. 199-310. Logmam. Inc. New York.
- H-Kittikun A, Prasertsan P, Srisuwan G, Krause A. 2000. Environmental Management for Palm Oil Mill. In *Proceeding of Internet Conference on Material Flow Analysis of Integrated Bio-Systems*. Japan. March-October 2000. p. 6-4.
- Huang, G.L., Liua, M.X. and Mei, X.Y. 2004. Synthesis, (1.3)- $\beta$ -D-glucanase-binding ability and phytoalexin elicitor activity of a mixture of 3, 4-epoxybutyl (1.3)- $\beta$ -D-oligoglucosides. *Carbohydr. Res.* 339: 1453-1457.
- Hwang, T.K., Ong, S.M., Seow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluents. *Planter, Kuala Lumpur.* 54: 749-756.

- Isaka, M. and Tanticharoen, M. 2001. Structures of cordypyridones A-D, antimalarial N-hydroxy and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. J. Org. Chem. 66: 4803-4808.
- Isaka, M., Kittakoop, P., Kirtikara, K., Hywel-Jones, N.L. and Thebtaranonth, Y. 2005. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. Acc. Chem. Res. 38: 813-823.
- Kampa, M., Alexaki, V.-I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A. and Castanas, E. 2003. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. Breast Cancer Res. 6: R63-R74.
- Kaplan, H. and Hutkins, R.W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2682-2684.
- Kawabata, K., Yamamoto, T., Hara, A., Shimizu, M., Yamada, Y., Matsunaga, K., Tanaka, T. and Mori, H. 2000. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Cancer Lett. 157: 15-21.
- Kim, H.O. and Yun, J.W. 2005. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. J. Appl. Microbiol. 99: 728-738.
- Kim, S.-W., Hwang, H.-J., Xu, C.-P., Sung, J.-M., Choi, J.-W. and Yun, J.-W. 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. J. Appl. Microbiol. 94: 120-126.
- Kitakaze, M. and Hori, M. 2000. Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. Expert. Opin. Investig. Drugs 9: 2519-2535.
- Kittakoop, P., Punya, J., Kongsaree, P., Lertwerawat, Y., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 1999. Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. Phytochem. 52: 453-457.
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T. and Heinze, U. 1998. Comprehensive Cellulose Chemistry. Fundamentals and Analytical Methods. Vol. 1. WILEY-VCH. 266. Weinheim, Germany:
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P. And Bohn, A. 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angew. Chem. Int. 44: 3358-3393.



- Kodama, E.N., McCaffrey, R.P., Yusa, K. and Mitsuya, H. 2000. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT<sup>+</sup>) leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.* 59: 273-281.
- Koh, J.H., Yu, K.W., Suh, H.J., Choi, Y.M. and Ahn, T.S. 2002. Activation of macrophages and the intestinal immune system by an orally administered decoction from culture mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 407-411.
- Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G.R. 2000. The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. *Brit. Nutr. Found.* 25: 223-231.
- Kontula, P., von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T. 1998. Oat bran  $\beta$ -gluco- and xylo-oligosaccharides as fermentative substrates for lactic acid bacteria. *Int. J. food Microbiol.* 45: 163-169.
- Kontula, P., Suihko, M.-L., Suortti, T., Tenkanen, M., Mattila-Sandholm, T. and von Wright, A. 2000. The isolation of lactic acid bacteria from human colonic biopsies after enrichment on lactose derivatives and rye arabinoxylo-oligosaccharides. *Food Microbiol.* 17: 13-22.
- Kunioka, M. 1997. Biosynthesis and chemical reaction of poly (amino acid) from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 469-475.
- Kurane, R. and Nohata, Y. 1991. Microbial flocculation of waste liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1127-1119.
- Kurane, R., Hatamochi, K., Kukuno, T., Kiyohara, M., Kawaguchi, K., Mizuno, Y., Hirano, M. and Taniguchi, Y. 1994. Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1977-1982.
- Kwon, G.S., Moon, S.H., Hong, S.D., Lee, H.M., Kim, H.S., Oh, H.M. and Yoon, B.D. 1996. A novel flocculant biopolymer produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637p. *Biotechnol. Lett.* 18: 1459-1464.
- Lagaert, S., Campenhout, S.V., Pollet, A., Bourgois, T.M., Delcour, J.A., Courtin, C.M. and Volckaert, G. 2007. Recombinant expression and characterization of a reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase from *Bifidobacterium adolescentis*. *App. Envir. Microbiol.* 73: 5374-5377.

- Lee, B., Bae, J., Pyo, H., Choe, T. and Kim, S. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 369-376.
- Li, B., Xie, B. and Kennedy, J.F. 2006. Studies on the molecular chain morphology of konjac glucomannan. *Carbohydr. Polym.* 64: 510–515.
- Li, S.P., Zhao, K.J., Song, Z.H., Dong, T.T., Lo, C.K., Cheung, J.K., Zhu, S.Q. and Tsim, K.W. 2003. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Life Sci.* 73: 2503-2513.
- Li, W.W., Zhou, W.Z., Zhang, Y.Z., Wang, J. and Zhu, X.B. 2008. Flocculation behavior and mechanism of an exopolysaccharide from the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Bioresour. Technol.* 99: 6893–6899.
- Liyama, K., Lam, T.B.-T. And Stone, B.A. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320.
- Lopez, M. J. and Ramos-Cormenzana, A. 1996. Xanthan production from olive-mill wastewaters. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 263-270.
- Luangwitchajaroen, Y., Siralermukul, K. and Nimmannit, U. 2007. Extraction and characterization of arabinoxylan hemicellulose from rice bran. 33<sup>rd</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. Walailak University, Nakorn Si Thammarat, Thailand. 18-20 October 2007.
- Madla, S., Methacanon, P., Prasitsil, M. and Kirtikara, K. 2005. Characterization of biocompatible fungi-derived polymers that induce IL-8 production. *Carbohydr. Polym.* 59: 275-280.
- Marco, E.D., Savarese, M., Paduano, A. and Sacchi, R. 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemis.* 104: 858–867.
- McAuley, K.E., Svendsen, A., Patkar, S.A. and Wilson, K.S. 2004. Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* (2004). D60: 878-887.
- Methacanon, P., Madla, S., Kirtikara, K. and Prasitsil, M. 2005. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. *Carbohydr. Polym.* 60: 199–203.

- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Montgomery, D.C. 1999. Experimental design for product and process development. *The Statistician.* 48: 159-177.
- Montgomery, D.C. 2001. *Design and Analysis of Experiments.* 5<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons Inc. New Jersey.
- Morotomi, M., Guillem, J.G., LoGerfo, P. and Weinsten, I.B. 1990. Production of diacylglycerol an activator of protein kinase C by human intestinal microflora. *Cancer Res.* 50: 3595-3599.
- Mussatto, S.I. and Mancilha, I.M. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* 68: 587-597.
- Myers, R.H. 1995. *Response Surface Methodology: Process and Production Optimization Using Designed Experiments.* John Wiley & Sons Inc. New Jersey.
- Nakamura, J., Miyashiro, S. and Hirose, Y. 1976a. Modes of flocculation of yeast cell with flocculant produced by *Aspergillussojiae* AJ-7002. *Agric. Biol. Chem.* 40:1565–1571.
- Nakamura, J., Miyashiro, S. and Hirose, Y. 1976b. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agric. Biol. Chem.* 40: 377–383.
- Nam, J.S., Kwon, G.S., Lee, S.O., Hwang, J.S., Lee, J.D. and Yoon, B.D. 1996. Bioflocculant produced by *Aspergillus* sp. JS-42. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 325–337.
- Nielson, J. 1996. Modeling the growth of filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 46: 187-223.
- Odian, G. 1993. Introduction. *In Principle of Polymerization.* 4<sup>th</sup> ed (Odian, G, ed.). p. 1-38. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Oh, J.-Y., Cho, E.-J., Nam, S.-H., Choi, J.-W. and Yun, J.-W. 2007. Production of polysaccharide–peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. *Process Biochem.* 42: 352-362.
- Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K. And Ikeda, H. 1995. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Microbiol. Rev.* 56: 415-420.

- Oku, T. and Nakamura, S. 2002. Digestion, absorption, fermentation and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. *Pure Appl. Chem.* 74: 1253-1261.
- Olano-Martin, E., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2002. Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 93: 505-511.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *Brit. J. Nutr.* 83: 247-255.
- Ouwehand, A., Derrien, M., Vos, W.D., Tiihonen, K. and Rautonen, N. 2005. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 212-217.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65: 859-867.
- Park, C., Hong, S.H., Lee, J.Y., Kim, G.Y., Choi, B.T., Lee, Y.T., Park, D.J. Park, Y.M., Jeong, Y.K. and Choi, Y.H. 2005. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis. *Oncol. Rep.* 13: 1211-1216.
- Peixoto, F., Martins, F., Amaral, C., Gomes-Laranjo, J., Almeida, J. and Palmeira, C.M. 2008. Evaluation of olive oil mill wastewater toxicity on the mitochondrial bioenergetics after treatment with *Candida oleophila*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70: 266-275.
- Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. 1989. Effect of the pH dependence of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. *Cancer Res.* 49: 4435-4440.
- Pramjit, S. 2004. Chemical constituents from *Penicillium* sp. BCC7540, *Cordyceps militaris* BCC2816 and BCC2819. Master of Science Thesis in Organic Chemistry. Prince of Songkla University.
- Prasanthi, V., Nikku, M.Y., Vuddaraju, S.P., Nalla, K.K., Raju, C.A.I. and Donthireddy, S.R.R. 2008. Optimization of the fermentation media using statistical approach and artificial neural networks for the production of an alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *Int. J. Natur. Eng. Sci.* 2: 51-56.

- Prasertsan, P., Dermlim, W., Doelle, H. and Kennedy, J.F. 2006. Screening, characterization and focculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydr. Polym.* 66: 289–297.
- Prasertsan, S. and Prasertan, P. 1996. Biomass residues from palm oil mills in Thailand: An overview on quantity and potential usage. *Biomass Bioenergy.* 11: 387-395.
- Reddy, B.S. 1998. Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies. *British J. Nutri.* 80: S219-S223.
- Ren, J.-L., Peng, F. and Sun, R.-C. 2008. Preparation and characterization of hemicellulose derivatives containing carbamoylethyl and carboxyethyl groups. *Carbohydr. Res.* 343: 2776-2782.
- Robert, J.A., Ryden, P., Botham, R.L., Reading, L., Gibson, G. and Ring, S.G. 2001. Structural properties of diet-derived polysaccharides and their influence on butyrate production during fermentation. *Brit. J. Nutr.* 81: S219-S223.
- Rycroft, C.E., Rastall, R.A. and Gibson, G.R. 2001. The Role of Prebiotics in Human Gut Microbiology *In Novel Frontiers in the Production of Compounds for Biomedical Use.* 411-428. Kluwer academic publishers. Netherlands.
- Saito, Y., Takano, T. and Rowland, I. 1992. Effect of soybean oligosaccharides on the human gut microflora *in vitro* culture. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 5: 105-110.
- Sako, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and application of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9: 69-80.
- Salehizadeh, H. and Shojaosadati, S.A. 2001. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 19: 371–385.
- Saha, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 279-291.
- Sankpal, N.V., Joshi, A.P., Sainkar, S.R. and Kulkarni, B.D. 2001. Production of dextran by *Rhizopus* sp. immobilized on porous cellulose support. *Process Biochem.* 37: 395–403.
- Schiffirin, E.J., Rochat, F. and Link-Amster, H.A. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 78: 1597-1606.
- Selbmann, L., Onfri, S., Fenice, M., Federici, F. and Petruccioli, M. 2002. Product and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Microbiol. Res.* 153: 585-592.

- Shih, I.L. and Van, Y.T. 2001. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* 79: 207-225.
- Shih, I.L., Van, Y.T., Yeh, L.C., Lin, H.G. and Chang, Y.N. 2001. Production of biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour. Technol.* 78: 267-272.
- Shih, I.L., Tsai, K.L. and Hsieh, C. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochem. Eng. J.* 33: 193–201.
- Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T. and Sakai, H. 1984. Antimicrobial action of  $\epsilon$ -poly-L-Lysine. *J. Antibiot.* 37: 1449-1455.
- Skehan, P., Ritsa, S. and Dominic, S. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1107-1112.
- Smith, M.E. and Morton, D.G. 2001. Digestion and Absorption. *In The Digestive System.* p. 133-156. Churchill Livingstone Press. London.
- Sugar, A.M. and Mccaffrey, R.P. 1998. Antifungal activity of 3-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 1424-1427.
- Suh, H.H., Kwon, G.S., Lee, C.H., Kim, H.S., Oh, H.M. and Yoon, B.D. 1997. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 108-112.
- Sutherland, I.W. 1990. Introduction and Definition. *In Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides.* p. 1-11. Redwood Press Ltd. Great Britain.
- Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16: 41-46.
- Takagi, H. and Kadowaki, K. 1985. Poly-galactosamine produced by a microorganism. *Chitin. Nat. Technol.* 3: 121–128.
- Takeda, M., Kurane, R., Koizumi, J. and Nakamura, I 1991. A protein bioflocculant produce by *Rhodococcus erythropolis*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 25-31.
- Tanaka, T, Kojima, T., Kawamori, T., Suzui, M., Okamoto, K., Mori, H. 1993. Inhibition of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis.* 14: 1321-1325.

- Taylor, E.J., Smith, N.L., Turkenburg, J.P., D'Souza, S., Gilbert, H.J. and Davies, G.J. 2006. Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Ara51, from *Clostridium thermocellum*. J. Biochem. 395: 31-37.
- Terada, A., Hara, H., Kataoka, M. and Mitsuoka, T. 1992. Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal flora. Microb. Ecol. Health Dis. 5: 43-50.
- Tong, Z., Zhe, L. and Huai-lan, Z. 1999. Microbial flocculant and its application in environmental protection. J. Environ. Sci. 11: 1-12.
- Triveni, R. and Shamala, T.R. 1998. Clarification of xanthan gum with extracellular enzymes secreted by *Trichoderma koningii*. Process Biochem. 34: 49-53.
- Van de loo, H.-M. 1976. An improved method for the quantitative determination of hexosamines according to Elson and Morgan. Anal. Biochem. 76: 556-560.
- Van den Broek, L.A., Lloyd, R.M., Beldman, G., Verdoes, J.C., McCleary, B.V. and Voragen, A.G. 2005. Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 641-647.
- Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H. And Parajo, J.C. 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. Trends Food Sci. Technol. 11: 387-393.
- Vinarta, S.C., Molina, O.E., Figueroa, L.I.C. and Farin, J.I. 2006. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii*. Food Hydrocolloid. 20: 619-629.
- Wang, X. and Gibson, G.R. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. J. Appl. Bacteriol. 75: 373-380.
- Wang, H.X., Liu, W.K., Ng, T.B., Ooi, V.E.C. and Chang, S.T. 1995. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. Life Sci. 57: 269-281.
- Watanabe, M., Suzuki, Y., Sasaki, K., Nakashimada, Y. and Nishio, N. 1999. Flocculating property of extracellular polymeric substrate derived from a marine photosynthetic bacterium, *Rhodovulum* sp. J. Biosci. Bioeng. 87: 625-629.
- Weiner, R.M. 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. TIBTECH. 15: 390-394.

- West, T.P. and Strohfus, B. 2001. Polysaccharide production by immobilized *Aureobasidium pullulans* cells in batch bioreactors. *Microbiol. Res.* 156: 285-288.
- Wichienchot, S. 2005. Production of Oligodextrans by *Gluconobacter oxydans* NCIMB4943 and Evaluation on their Prebiotic Properties. Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Wu, J.-Z., Cheung, P.C.K., Wong, K.-H. and Huang, N.-L. 2004. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chem.* 85: 101–105.
- Wu, J.Y. and Ye, H.F. 2007. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. *Process Biochem.* 42: 1114-1123.
- Xiao, J.H., Chen, D.X., Xiao, Y., Liu, J.W., Liu, Z.L., Wan, W.H., Fang, N., Tan, B.B., Liang, Z.Q. and Liu, A.Y. 2004. Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. *Process Biochem.* 39: 2241–2247.
- Yamamoto, Y., Yakahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S. and Yamaguchi, H. 1999. *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.* 10: 13-18.
- Yang, B.K., Ha, J.Y., Jeong, S.C., Das, S., Yun, J.W., Lee, Y.S., Choi, J.W. and Song, C.H. 2000. Production of exo-polymers by submerged mycelial culture of *Cordyceps militaris* and its hypolipidemic effect. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 784-788.
- Yang, J., Zhang, W., Shi, P., Chen, J., Han, X. and Wang, Y. 2005. Effects of exopolysaccharide fraction (EPSF) from cultivated *Cordyceps sinensis* fungus on c-Myc, C-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice. *Pathol. Res. Pract.* 201: 745-750.
- Yokoi, H., Arima, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1996. Flocculation properties of polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 84–87.
- Yokoi, H., Natsuda, O., Hirose, Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1995. Characteristic of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY-90. *J. Ferment. Bioeng.* 79: 378-380.
- Yokoi, H., Obita, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 2002. Flocculation properties of pectin in various suspensions. *Bioresour. Technol.* 84: 287-290.



- Yokoi, H., Yoshida, T., Mori, S., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1997. Biopolymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp. *Biotechnol. Lett.* 19: 569-573.
- Yu, R., Song, L., Zhao, Y., Bin, W., Wang, L., Zhang, H., Wu, Y., Ye, Y. and Yao, X. 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* 75: 465-472.
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K. and Wang, Q. 2006. Antitumor polysaccharides from mushrooms : a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 4-19.
- Zhou, X.X., Meyer, C.U., Schmidtke, P. and Zepp, F. 2002. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Pharmacol.* 453: 309-317.

**ภาคผนวก ก**  
**การเตรียมสารเคมี**

**1. องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Agar (NA)**

**องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

**วิธีการเตรียม**

ชั่งอาหาร 0.8 กรัม (NB) และ 23.0 กรัม (NA) ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร (อาหาร NB ไม่ต้องใส่ agar) คนให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Mueller Hington Broth**

**องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัมต่อลิตร
Starch	1.5	กรัมต่อลิตร

**วิธีการเตรียม**

ชั่งอาหาร 21.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Mueller Hington Agar**

**องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัมต่อลิตร
Starch	1.5	กรัมต่อลิตร
Agar	17	กรัมต่อลิตร

## วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร 38.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 1.4 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS)

#### องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Proteose peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Polysorbate 80	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.1	กรัมต่อลิตร
Manganes sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร

## วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร 55.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับการเตรียมเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร และเติม Bromocresol purple 0.05 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก

### 1.5 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร Minimal medium

#### องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone water	2	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.10	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04	กรัมต่อลิตร
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04	กรัมต่อลิตร

CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัมต่อลิตร
NaHCO <sub>3</sub>	2	กรัมต่อลิตร
Tween 80	2	มิลลิลิตรต่อลิตร
Cysteine-HCl	0.50	กรัมต่อลิตร
Bile salt	0.50	กรัมต่อลิตร
Hemin	0.05	กรัมต่อลิตร

#### วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารแต่ละส่วนประกอบต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. สารเคมีสำหรับเตรียม HCl buffer

##### องค์ประกอบ

NaCl	8.00	กรัมต่อลิตร
KCl	0.20	กรัมต่อลิตร
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8.25	กรัมต่อลิตร
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.35	กรัมต่อลิตร
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.10	กรัมต่อลิตร
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.18	กรัมต่อลิตร
HCl 5 M		

#### วิธีการเตรียม

ชั่งแต่ละส่วนประกอบละลายในน้ำกลั่น 0.8 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

#### 3. สารเคมีที่ใช้ทดสอบการทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์

##### 3.1 การเตรียมเอนไซม์

เอนไซม์ human pancreatic  $\alpha$ -amylase (Himedia) ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใน (20 mM) ในโซเดียมคลอไรด์ (6.7 mM) ซึ่งปรับพีเอชให้ได้ 6.9 โดยใช้ 1 N NaOH

### 3.2 สารเคมีสำหรับเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

#### องค์ประกอบ

NaCl	9	กรัมต่อลิตร
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	9	กรัมต่อลิตร
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	กรัมต่อลิตร
5 M HCl		

#### วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีแต่ละส่วนประกอบต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับพีเอชเป็น 1, 2, และ 3 ด้วย 5 M HCl

### 4. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Copper-bicinchoninate (Foxand Robyt, 1991 อ้างโดย นันทินา เชิญทอง, 2550)

#### องค์ประกอบและวิธีการเตรียม

##### Solution A

1. ชั่ง Sodium carbonate 2.74 กรัม
2. ชั่ง Sodium bicarbonate 1.2 กรัม
3. ละลายในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร
4. เติม disodium 2,2-bicinchoninate 97.1 มิลลิกรัม
5. ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

##### Solution B

1. ชั่ง Copper sulfate pentahydrate 62 มิลลิกรัม
2. ชั่ง L-serine 63 มิลลิกรัม
3. ละลายในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

##### Solution C

ผสม solution A และ B ในอัตราส่วนที่เท่ากัน และใช้สารละลายน้ำตาล maltose ความเข้มข้น 1-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี **Modified phenol sulfuric acid**

Phenol 50 กรัมต่อลิตร

Conc. Sulfuric acid

วิธีการเตรียม

ชั่ง phenol ตามปริมาณที่กำหนด ละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี **Modified dinitrosalicylic acid**

องค์ประกอบ

NaOH	10	กรัมต่อลิตร
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0.5	กรัมต่อลิตร
Sodium potassium tartrate	200	กรัมต่อลิตร
3, 5-Dinitrosalicylic acid	10	กรัมต่อลิตร
Phenol	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง NaOH ตามปริมาณที่กำหนด ละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นนำส่วนประกอบที่เหลือละลายในสารละลาย NaOH ที่เตรียมไว้ คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer พร้อมกับให้ความร้อน เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

**ภาคผนวก ข**  
**วิธีการวิเคราะห์**

**1. การวิเคราะห์ซีโอดีด้วยวิธีฟลักซ์แบบเปิด**

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์รีฟลักซ์ ประกอบด้วย ขวดรีฟลักซ์รูปกรวย (ขวดซีโอดี) ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เครื่องควบแน่นยาว 600 มิลลิลิตร
3. เตาให้ความร้อน (hot plate)
4. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
5. ฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพตัสเซียมไดโครเมต 0.25 N เตรียมโดยละลายโพตัสเซียมไดโครเมต ( $K_2Cr_2O_7$ ) (อบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง) 12.259 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร
2. สารละลายกรดซัลฟูริก เตรียมโดยเติมซิลเวอร์ซัลเฟต 22 กรัม ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4 กิโลกรัม (~2.65 ลิตร) ทิ้งไว้ 1 ถึง 2 วัน เพื่อให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลาย
3. สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ ละลาย 1, 10-ฟีแนนโทรีน โมโนไฮเดรต ( $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$ ) 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot H_2O$ ) 0.695 กรัม ในน้ำกลั่นและเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร
4. เมอร์คิวริกซัลเฟต ( $HgSO_4$ )
5. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous ammonium sulfate: FAS) เตรียมที่ความเข้มข้น 0.25 N เตรียมโดยละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ) ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอน โดยเปิดสารละลายมาตรฐานโพตัสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นเติมเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

การคำนวณความเข้มข้นสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

$$\text{ความเข้มข้น FAS (นอร์มอล)} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายโพตัสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

## วิธีการวิเคราะห์

มี 2 วิธีขึ้นกับความสกปรกของตัวอย่างคือ

- ตัวอย่างที่มีค่าซีโอดีมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ตัวอย่างที่มีค่าซีโอดีน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

I ตัวอย่างที่มีค่าซีโอดีมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. เติมเมอร์คิวริกซัลเฟตประมาณ 0.4 กรัมลงในขวดซีโอดี ใส่ลูกแก้ว 2-3 ลูก
2. เติมตัวอย่างน้ำที่เจือจางเหมาะสม (ซีโอดีระหว่าง 500-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมสารละลายกรดซัลฟูริก 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อป้องกันการระเบิดเนื่องจากความร้อนสะสมของกรดซัลฟูริกที่กักขวด
4. นำขวดซีโอดีต่อเข้ากับเครื่องควมแน่น แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านเครื่องควมแน่น ต้มให้เดือดนาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ถอดขวดซีโอดีออกจากเครื่องควมแน่น เติมเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล วัดปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นแทน

## การคำนวณค่าซีโอดี

$$\text{ซีโอดี (มล.ต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}}$$

ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)

เมื่อ A คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

## **2. สารฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol) (โสภาวรรณ รัตนพันธุ์ (2547)) ดัดแปลงจากวิธีการหาแทนนิน APHA AWWA and WEF (1998)**

### สารเคมี

1. น้ำยาคาร์บอนต-ทาร์เทรต

ละลาย  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 12 กรัม ด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 750 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องก่อนปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. น้ำยาโฟลีนส์ฟีนอล



## วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. เติมโพลินัสฟินอล 0.1 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำยาคาร์บอนेट-ทาร์เทรต 1.0 มิลลิลิตร
4. รอให้เกิดสี 30 นาที
5. วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นฟินอลจากกราฟมาตรฐาน แบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ
6. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายฟินอลที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1-5

## การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นฟินอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่าง} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

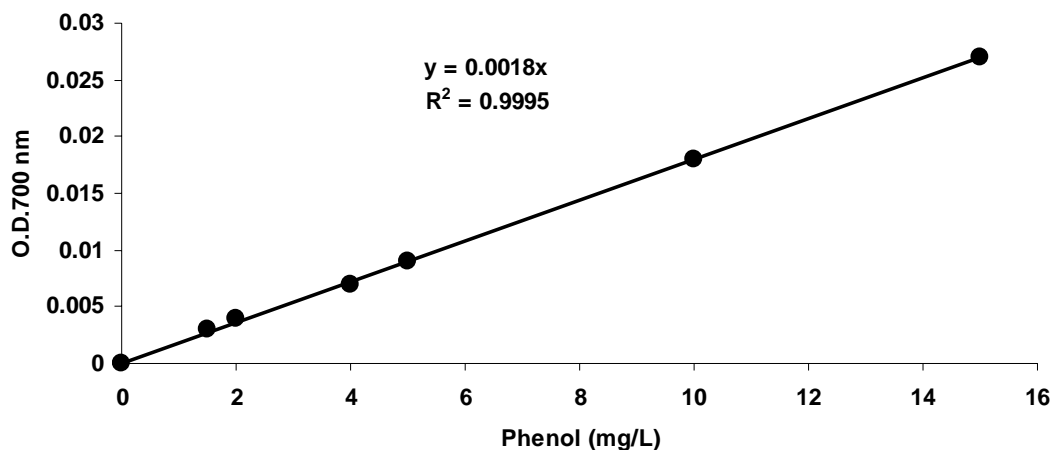


Figure-Appendix 1. Standard curve of phenol solution

3. น้ำตาลทั้งกลุ่มคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) และคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ด้วยวิธี Ferric-orcinol assay และ L-cysteine hydrochloride assay ตามลำดับ (Chaplin and Kennedy, 1986)

### 3.1 Ferric-orcinol assay

#### สารเคมี

สารละลาย A: เตรียมสารละลาย Trichloroacetic acid ในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 10% (w/v)

**สารละลายB:** เตรียมสารละลาย Ferric ammonium sulphate ความเข้มข้น 1.15% (w/v) และเตรียม orcinol ความเข้มข้น 0.2% (w/v) ใน 9.6 M HCl (สารละลาย B เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

**สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน:** เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 mg/ml โดยใช้น้ำเป็นตัวละลาย

**สารละลายพอลิเมอร์:** ละลายพอลิเมอร์ชีวภาพในน้ำความเข้มข้น 1mg/ml

**วิธีทดลอง:** คุ้ดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานไซโลส สารละลายพอลิเมอร์ชีวภาพ และสารละลายควบคุม (น้ำ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A 200 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว เติมสารละลาย B 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปต้มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรและความเข้มข้นของน้ำตาลมาตรฐาน Figure-Appendix 2a ซึ่งค่าที่ได้จากสมการนำไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาล pentose ในพอลิเมอร์ชีวภาพ

### 3.2 L-cysteine hydrochloride assay

**สารเคมี:**

**สารละลาย A:** Ice-cold 86% (V/V) sulphuric acid (เตรียมโดยเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 860 มิลลิลิตรในน้ำ 140 มิลลิลิตร)

**สารละลายB:** เติม L-cysteine hydrochloride (700 mg/l) ในสารละลาย A (ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส)

**สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน:** เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 mg/ml และสารละลายน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 mg/ml โดยใช้น้ำเป็นตัวละลาย

**สารละลายพอลิเมอร์:** ละลายพอลิเมอร์ชีวภาพในน้ำความเข้มข้น 1mg/ml

**วิธีทดลอง:** คุ้ดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส สารละลายพอลิเมอร์ชีวภาพ และสารละลายควบคุม (น้ำ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย B 1 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็วแล้วเขย่าผสมแซ่ในอ่างน้ำแข็ง นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 3 นาทีแล้วทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตรและความเข้มข้นของน้ำตาลมาตรฐาน Figure-Appendix 2b ซึ่งค่าที่ได้จากสมการนำไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาล hexose ในพอลิเมอร์ชีวภาพ

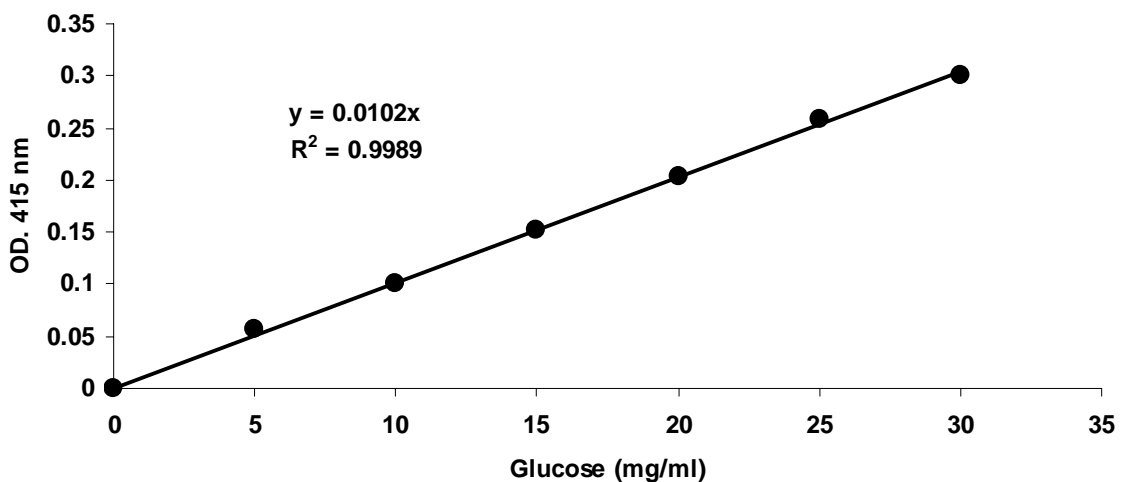
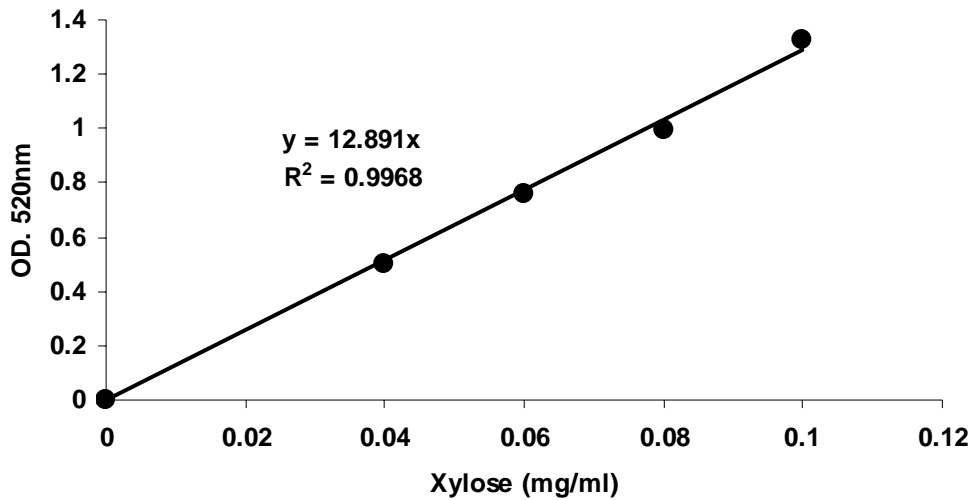


Figure-Appendix 2. Standard curve of xylose solution (a) and glucose solution (b) analyzed by ferric-orcinol assay and L-cysteine hydrochloride assay respectively

#### 4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลาง โดยปฏิกิริยา Anthrone reaction (Chaplin and Kennedy, 1986)

สารพวกคาร์โบไฮเดรตเมื่อนำมาให้ความร้อนร่วมกับแอนโทรนในสารละลายกรดซัลฟิวริก ทำให้น้ำตาลถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปอนุพันธ์ของเฟอพิวริล ซึ่งอนุพันธ์นี้จะรวมตัวกับแอนโทรนได้สารประกอบสีเขียว

##### สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) ความเข้มข้น 75 % (v/v) เตรียมโดยนำกรดซัลฟิวริกเข้มข้นมา 750 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2. Anthrone reagent: เตรียมโดยการเติมแอนโทรน 200 มิลลิกรัมในเอทานอล 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยการเติมกรดซัลฟิวริก (75 % (v/v)) ให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนละลาย รีเอเจนต์นี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งและเมื่อไม่มีการใช้งานควรเก็บไว้ในตู้เย็น
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยนำสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในกรดเบนโซอิก 0.15 % มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### วิธีการ

1. เติมน้ำตาลตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง รอจนน้ำตาลเย็นลง
3. เติม anthrone reagent ที่แช่เย็นไว้ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน (ขณะเติมและเขย่า ต้องให้หลอดทดลองอยู่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา)
4. แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งจนทุกหลอดเย็นลงถึง 0 องศาเซลเซียส
5. นำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงอีกครั้งในอ่างน้ำแข็ง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส แบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

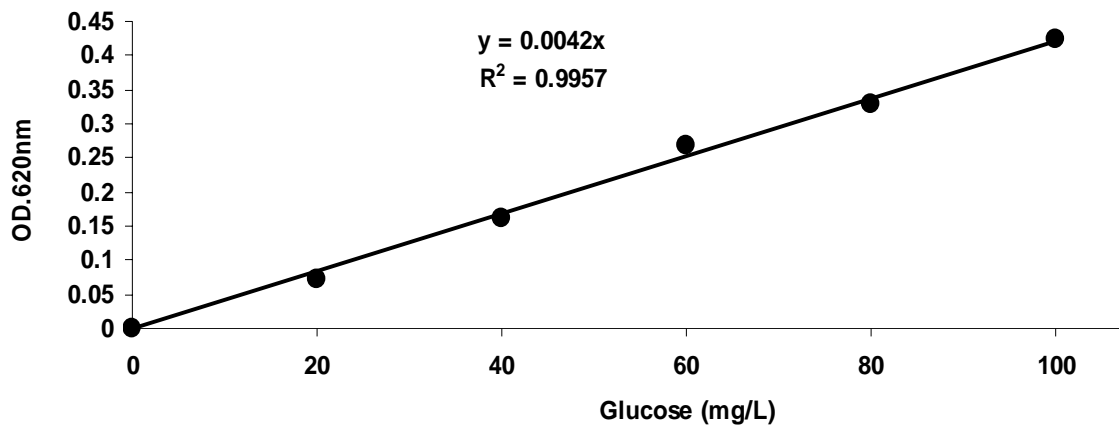


Figure-Appendix 3. Standard curve of standard solution glucose analyzed by anthrone method

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิก โดยวิธี Carbazole assay (chaplin and Kennedy, 1986)

### สารเคมี

1. Reagent A: ผสม sodium tetraborate decahydrate 0.95 กรัม ในน้ำ 2 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก 98 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและแช่ในอ่างน้ำแข็ง
2. Reagent B: ผสม carbazole 125 มิลลิกรัม และ absolute ethanol 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารละลายมาตรฐาน glucuronic acid lactone ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง สารละลายมาตรฐาน และน้ำกลั่นปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติม reagent A ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและแช่เย็นทันที
3. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่เย็นทันที
4. เติม reagent B ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แช่เย็นทันที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร

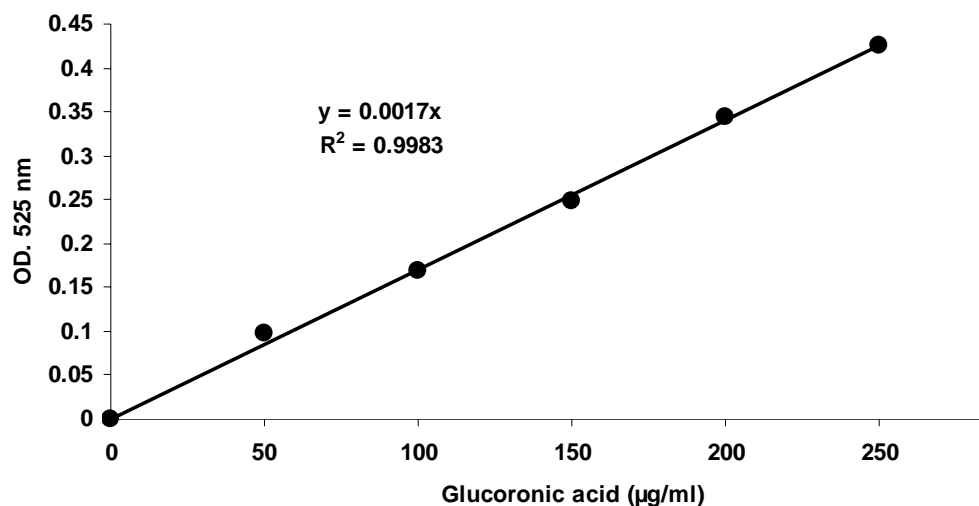


Figure-Appendix 4. Standard curve of glucuronic acid lactone

## 6. วิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Copper-bicinchoninate (Foxand Robyt, 1991)

- ผสมสารละลาย C ใส่ในหลอดของไมโครไตเตอร์เพลท หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- เติมน้ำตาลละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร
- ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วยพลาสติกใส (Polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิปล (plastic zipper bag) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที ทำให้เย็นทันทีเป็นเวลา 15 นาที
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

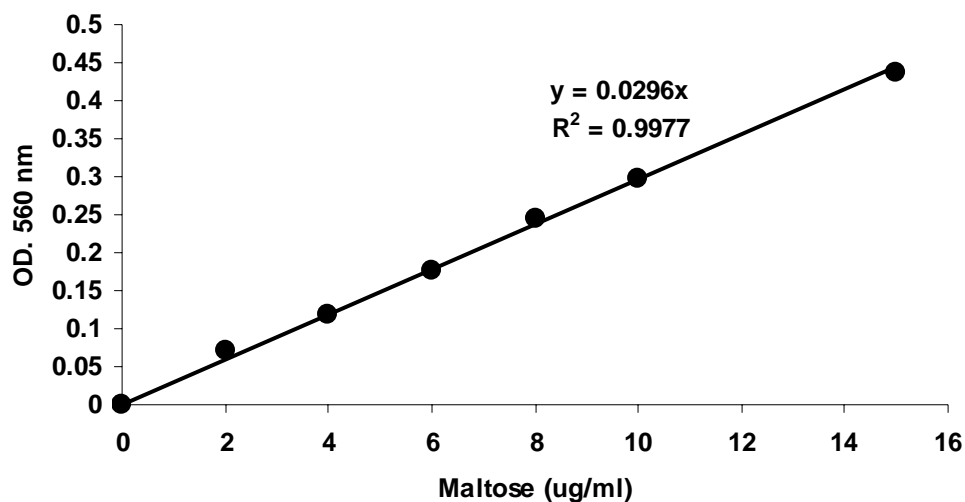


Figure-Appendix 5. Standard curve of reducing sugar analyzed by Copper-bicinchoninate method

## 7. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al.*, 2001)

### การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมน้ำตาลละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติมน้ำตาลละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วยพลาสติกใส (Polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิปล (plastic zipper bag) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

นาที่ ทำให้เขียนทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

#### การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาณ 100 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติมสารละลายกรดไคโนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วยพลาสติกใส (Polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิปล (plastic zipper bag) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เขียนทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐาน

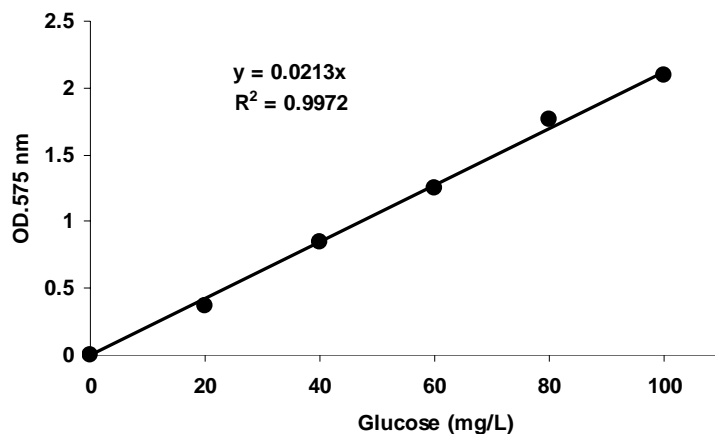


Figure-Appendix 6. Standard curve of reducing sugar analyzed by dinitrosalicylic acid method

#### 8. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยใช้วิธี Modified phenol sulfuric method (Fox and Robyt, 1991)

เติมตัวอย่างปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท และเติม 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) phenol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที) นำไมโครไตเตอร์เพลทวางบนก้อนน้ำแข็ง และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที) หุ้มไมโครไตเตอร์เพลทด้วยพลาสติกใส และนำไปใส่ในถุงซิปล (plastic zipper bag) นำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เขียนและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เทียบค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

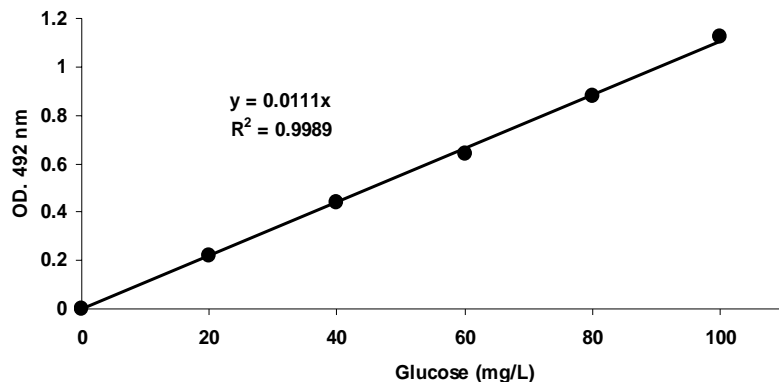


Figure-Appendix 7. Standard curve of total sugar analyzed by phenol-sulfuric acid method

## 9. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธี Morgan-Elson ที่ปรับปรุงแล้ว (Van de Loo, 1976)

### 9.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธี Cochran and Vercellotti (1978)

ซึ่งตัวอย่างอบแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วย 30 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

### 9.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

- สารละลาย Acetyl acetone reagent เตรียมโดยเติม 4% ของ Acetyl acetone ลงใน 1.25 M NaCO<sub>3</sub> (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)
- สารละลาย Ehrlich reagent เตรียมโดยละลาย Para-dimethylaminobenzadehyde 1.6 กรัม ในส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร และ 95% ethanol 30 มิลลิลิตร (เก็บในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน)
- สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride เตรียมโดยละลาย glucosamine hydrochloride 0.025 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

### 9.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Acetyl acetone reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เติม 95% ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการ



ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ กลูโคซามีน ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 25 – 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

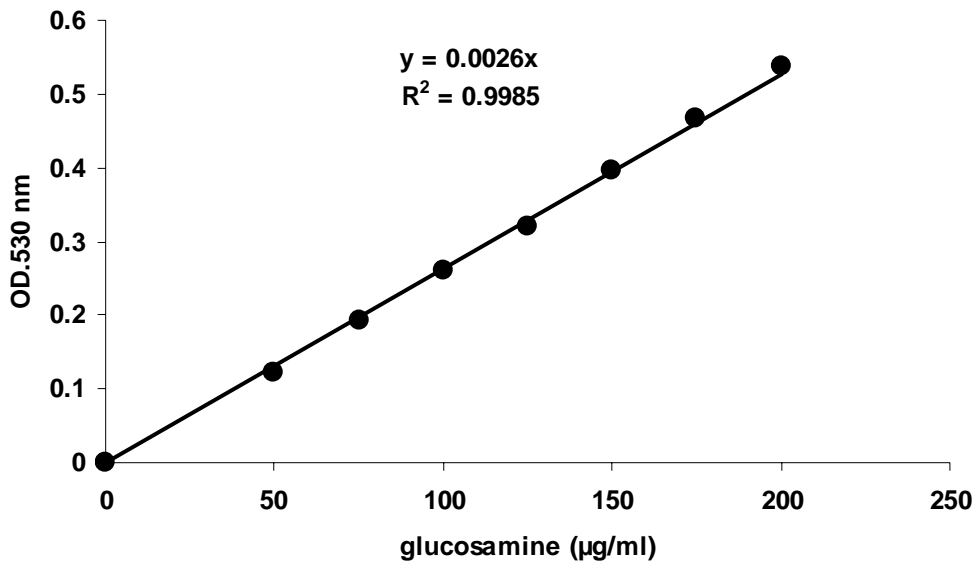


Figure-Appendix 8. Standard curve of glucosamine analyzed by method for the quantitative determination of hexosamines according to Elson and Morgan

## 10. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

### 10.1 จุลินทรีย์ก่อโรค

เจียเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลว MHB สำหรับแบคทีเรีย แล้วบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำเชื้อในระยะนี้มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของพอลิเมอร์ชีวภาพ โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้น ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร

### 10.2 แบคทีเรียโปรไบโอติก

เจียเชื้อ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* จาก stock culture มา 1 loop ใส่ลงใน อาหาร MRS หลว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ การถ่ายเชื้อลงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS หลว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะได้เชื้อจำนวน  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร

### 10.3 การนับจำนวนจุลินทรีย์

ในการนับจำนวนจุลินทรีย์จะนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ มาเจือจางจนถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด แล้ว pour plate โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร หยดลงไปในจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44-46 องศาเซลเซียสลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์กับอาหารให้เข้ากัน โดยแกว่งจานอาหารไปมาเบาๆ ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ แล้วรายงานผลเป็น CFU ต่อ มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

Table 1. Hydrolysis of the biopolymers in HCl buffer solution with pH 1, 2 and 3

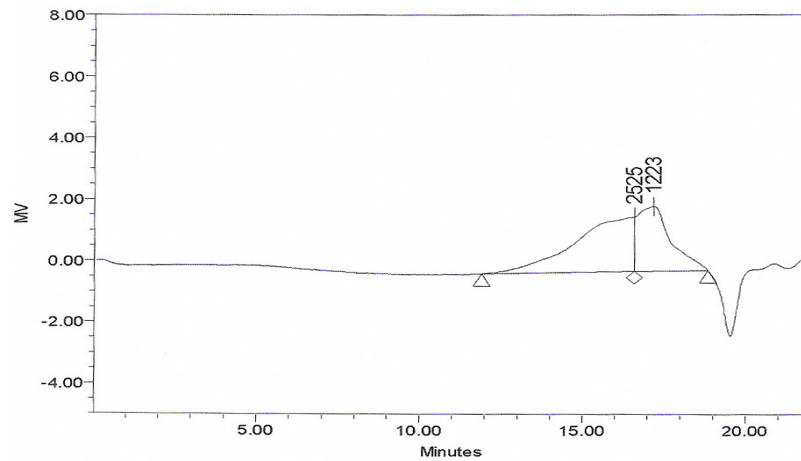
		Hydrolysis (%)		
Biopolymers from	Time (h)/pH	1	2	3
SC-S	½	1.69±0.030	1.70±0.051	1.60±0.035
	1	2.80±0.036	1.71±0.021	1.77±0.023
	2	2.90±0.005	1.95±0.074	1.72±0.013
	3	2.94±0.009	2.21±0.043	1.71±0.036
	4	2.81±0.034	2.65±0.059	1.84±0.013
SC-L	½	2.05±0.027	1.63±0.066	1.25±0.550
	1	2.14±0.013	1.41±0.011	1.56±0.042
	2	2.37±0.009	2.37±0.013	1.66±0.000
	3	2.16±0.059	2.16±0.013	1.71±0.009
	4	2.20±0.035	1.98±0.130	1.72±0.033
CP2073	½	1.71±0.045	1.32±0.054	1.18±0.048
	1	2.00±0.018	1.34±0.026	1.18±0.083
	2	2.10±0.036	1.43±0.031	1.37±0.033
	3	2.06±0.034	1.65±0.018	1.86±0.020
	4	2.54±0.052	1.47±0.001	1.75±0.033

Table 2. Enzymatic hydrolysis of biopolymer by  $\alpha$ -amylase

Biopolymers	Hydrolysis (%)
SC-S	7.84±0.141
SC-L	19.62±0.022
CP2073	29.91±0.055

Table 3. Growth of probiotic used biopolymers as carbon sources in minimal medium

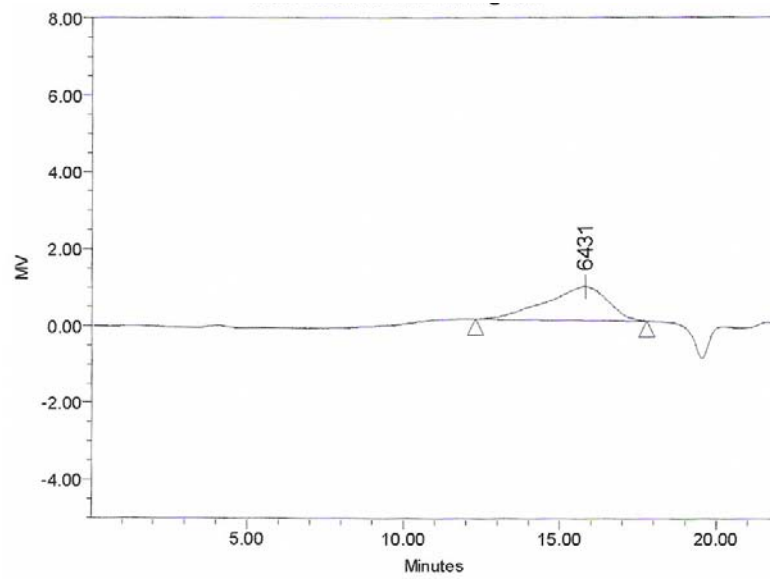
Biopolymer	Time (h)	log CFU/ml	
		<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>
SC-S	0	10.173±0.020	10.146±0.069
	6	10.748±0.441	10.732±0.012
	12	11.067±0.411	10.741±0.069
	24	11.348±0.008	10.812±0.087
	36	10.566±0.031	10.363±0.036
	48	10.046±0.057	10.149±0.160
	72	9.497±0.012	9.870±0.334
	Glucose	0	10.093±0.120
6		11.116±0.034	11.248±0.183
12		11.126±0.100	11.265±0.281
24		11.268±0.036	11.283±0.135
36		10.945±0.013	11.212±0.084
48		10.866±0.010	11.212±0.373
72		10.309±0.161	9.363±0.069
No C-source		0	10.194±0.394
	6	11.241±0.038	10.797±0.038
	12	10.734±0.186	10.531±0.186
	24	10.626±0.669	10.416±0.669
	36	10.318±0.097	10.337±0.097
	48	9.813±0.017	10.122±0.017
	72	9.187±0.054	9.830±0.054



**GPC Results**

	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Polydispersity	% Area
1	7451	26861	2525	126747	272883	3.604824	59.36
2	856	1233	1223	1543	1763	1.441077	40.64

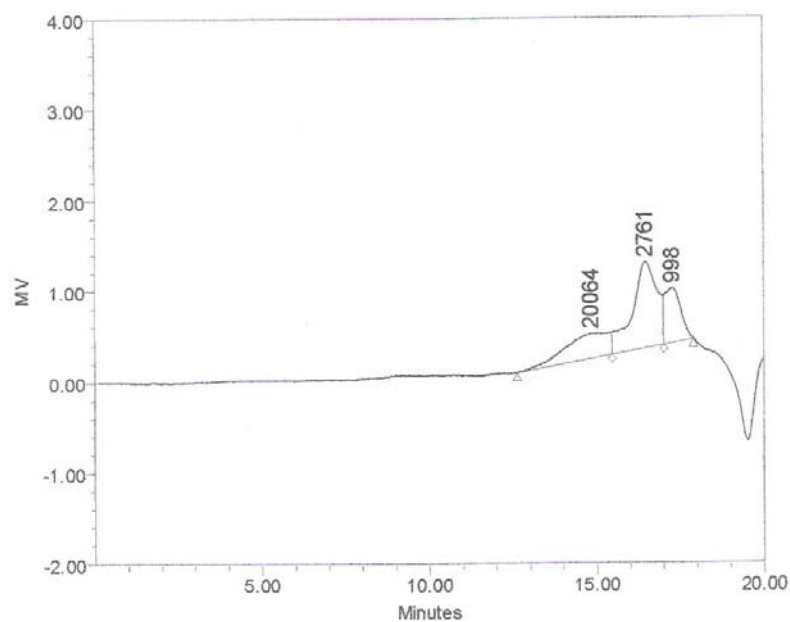
Figure-Appendix 9. GPC chromatogram of biopolymer from sterilizer condensate precipitated with 95% ethanol at ratio 5.0



**GPC Results**

	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Polydispersity
1	6135	22892	6431	82599	162092	3.731264

Figure-Appendix 10. GPC chromatogram of partially purified biopolymer SC-L



	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	22853	38249	20064	71813	120946	1.673717
2	2718	3404	2761	4418	5598	1.252571
3	931	987	998	1039	1086	1.059998

Figure-Appendix 11. GPC chromatogram of biopolymer from *Cordyceps dipterigena* BCC2073 cultivated in diluted sterilizer condensate after precipitation with 95% ethanol

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวจิตตพัฒน์ เพ็ญสวัสดิ์		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5011020039		
วุฒิการศึกษา			
	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนพัฒนาสาขาอุตสาหกรรมเกษตรผู้ความเป็นเลิศ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2550

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Pensawat, S. and Prasertsan, P. 2008. Properties of biopolymers from sterilizer condensate of palm oil mill. TSB 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008: Biotechnology for Global Care. October 14-17, 2008. Takasila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. Poster presentation.