



การคัดเลือก คุณสมบัติและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเล
**Screening, Characterization and Production of Exopolysaccharides
from Marine Bacteria**

ลดาวัลย์ ช่วยชาติ
Ladawan Chuaychart

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 การคัดเลือก คุณสมบัติและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจาก
ทะเล
ผู้เขียน นางสาวดาวัลย์ ช่วยชาติ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทริคีรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลาปี มณีรัตน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณ ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือก คุณสมบัติและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเล
ผู้เขียน	นางสาวดวาลย์ ช่วยชาติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียจากทะเลที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากตัวอย่างที่เก็บได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะหนืดบนอาหาร Yeast Peptone medium (YPM), Seawater medium (SWM) และ Zobell marine broth (ZMB) สามารถแยกได้ 76 ไอโซเลต เมื่อนำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPM, SWM และ ZMB และนำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลมีเพียง 5 ไอโซเลต เท่านั้นที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูง (2.45-3.05 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และเมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลต มาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเทียบเคียงลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต CNEP003, CNEP070 และ CNEP071 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T 99 เบอร์เซ็นต์ (1416 /1421) ขณะที่ไอโซเลต CNEP012 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* NBRC13719^T 99 เบอร์เซ็นต์ (1434/1441) ส่วนไอโซเลต CNEP079 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pseudoalteromonas ganghwensis* FR1302^T 98 เบอร์เซ็นต์ (1391/1418) และเมื่อนำเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหาร YPM, SWM และ ZMB พบว่าเชื่อดังกล่าวสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPM โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003, *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP070, *B. amyloliquefaciens* CNEP071 และ *B. subtilis* CNEP012 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 3.07, 2.87, 2.75, 2.62 และ 2.40 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดย *B. amyloliquefaciens* CNEP003 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YPM ที่มีซูโครสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 4.73 และ 5.67 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงเท่ากับ 10.36 กรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ

B. amyloliquefaciens CNEP003 สามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้สูงถึง 4 เท่า (12.48 กรัมต่อลิตร) หรือคิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 20.51 กรัมต่อกรัมโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ เมื่อศึกษาความเข้มข้นของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นพลาสติกไซเซอร์ต่อการขึ้นรูปฟิล์ม พบว่าที่ความเข้มข้นของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มมีลักษณะอ่อนนุ่มและมีความยืดหยุ่น ซึ่งสามารถวัดความหนาของแผ่นฟิล์มได้เท่ากับ 0.085 มิลลิเมตร ค่าความต้านทานแรงดึงได้เท่ากับ 1.781 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 76.92 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ผลิตได้ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.33×10^6 ดาลตัน จากการวัดด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC) เมื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วยเครื่อง Fourier-transform infrared (FT-IR) พบว่าประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิกและไฮดรอกซิล จากการวิเคราะห์โปรตอนที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) พบว่าสัญญาณที่ปรากฏใน ^1H NMR มีสัญญาณของโปรตอนแอลดีไฮด์ (aldehyde proton: $-\text{COH}$) และสัญญาณของโปรตอนไฮดรอกซิล (OH) และเมื่อวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และอะราบิโนส เป็นองค์ประกอบหลัก

Thesis Title Screening, Characterization and Production of Exopolysaccharides from Marine Bacteria
Author Miss. Ladawan Chuaychart
Major program Biotechnology
Acedemic Year 2009

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPSs) producing marine bacteria were isolated from specimens collected from the coastal areas in Thailand. Seventy six isolates showed the colony characteristics with ropiness on modified Yeast Peptone medium (YPM), Seawater medium (SWM) and Zobell marine broth (ZMB). Among seventy six isolates, only five isolates were found to produce a significant amount of exopolysaccharides (2.45 – 3.05 g/g dry cell weight) recovered from the culture supernatant by ethanol precipitation. All five isolates were identified based on the morphological, physiological characteristics and 16S rDNA sequences. Isolates CNEP003, CNEP071 and CNEP070 were closely related to *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T with similarity of 99% (1416/1421) whereas strain CNEP012 was closely related to *Bacillus subtilis* NBRC13719^T with similarity of 99% (1434/1441). Strain CNEP079 was related to *Pseudoalteromonas ganghwensis* FR1302^T with similarity 98% (1391/1418). When cultivated in YPM medium, *B. amyloliquefaciens* CNEP003, *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP071, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 and *B. subtilis* CNEP012 produced exopolysaccharide at the concentrations of 3.07, 2.87, 2.75, 2.62 and 2.40 g/g dry cell weight, respectively. Maximal exopolysaccharides yields of 4.73 and 5.67g/g cell produced by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 were obtained when cultivated in YPM with an initial sucrose concentration of 60 g/l and yeast extract concentration of 8.47 g/l, respectively. At initial pH 7.5 and temperature of 45°C, the highest yield of exopolysaccharides was 10.36 g/g cell. Exopolysaccharides yield of *B. amyloliquefaciens* CNEP003 increased 4 times to 12.48 g/g cell or 20.51 g/g total cell protein within 96 h under optimized condition. Exopolysaccharides produced from *B. amyloliquefaciens* CNEP003 could be prepared as a thin film with glycerol (25% w/w) as a plasticizer. The film obtained from the exopolysaccharides was soft but though and flexible at

(5)

the possessing thickness of 0.085 mm. Its tensile strength was 1.781 N/mm^2 and an elongation at break is 76.92%. The average molecular weight of the exopolysaccharides was $2.33 \times 10^6 \text{ Da}$, when measured using Gel Permeation Chromatography (GPC). The Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum indicated the presence of dominant hydroxyl and carboxyl groups. The Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H NMR}$) spectrum indicated the presence of mainly aldehyde protons and hydroxyl protons of sugar, especially glucose and mannose. From High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis, exopolysaccharides produced by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 were mainly composed of glucose, mannose and arabinose.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัศววิทย์ กาญจนโอภาส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางการทำวิจัย และการเขียน วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรีรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วรรณ ชูฤทธิ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะและตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้โอกาสและกำลังใจ ในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมทุกท่านสำหรับกำลังใจ และความสนุกสนานในการทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไป ด้วยดี

ลดาวัลย์ ช่วยชาติ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES.....	(10)
LIST OF FIGURES.....	(11)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	3
วัตถุประสงค์.....	32
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ.....	33
วัสดุ อุปกรณ์.....	33
วิธีการทดลอง.....	36
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	52
การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในทะเลที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้.....	52
การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยวิธีการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA.....	59
การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยการเปรียบเทียบปริมาณของ เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื่อมแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้น.....	63
การหา Time course ของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเล ที่คัดเลือกได้.....	67
สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเลที่ คัดเลือกได้.....	69
การศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเลที่ คัดเลือกได้ในสภาวะที่เหมาะสม.....	78
คุณสมบัติของฟิล์มจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเล.....	84
การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้.....	90

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4. สรุปและข้อเสนอแนะ.....	97
เอกสารอ้างอิง.....	100
ภาคผนวก.....	116
ประวัติผู้เขียน.....	135

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Exopolysaccharides from bacteria with potential commercial application.....	4
2. Types of biopolymers containing β -D-glucans	11
3. Types of biopolymers containing α -D-glucans	13
4. Types of biopolymers containing heteropolysaccharides.....	14
5. Types of microorganism polysaccharides.....	17
6. Polymers obtained from marine bacteria and their application	24
7. Established applications of microbial exopolysaccharides.....	25
8. An applications of microbial exopolysaccharides in food industry.....	26
9. Reagents for PCR.....	40
10. Condition of PCR.....	40
11. Location, number of bacteria from specimens, gram staining characteristic and shape of exopolysaccharides producing marine bacteria.....	54
12. Exopolysaccharides production from marine bacteria isolated from the specimens collected in coastal areas in Thailand. Marine bacteria were cultivated in SWM, YPM and ZMB media.....	55
13. Identification results of exopolysaccharides producing strains by 16S rDNA analysis.....	60
14. Comparison of the amount of exopolysaccharides and yield of exopolysaccharides obtained from selected marine bacteria.....	64
15. Viscosity of exopolysaccharides obtained from marine bacteria cultivated in YPM broth and incubated at 45 °C for 96 h.....	67
16. Effect of exopolysaccharides and glycerol concentrations on thickness, tensile strength and elongation at brake of film from <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003.....	88
17. Isolates, medium, source and location for the isolation marine bacteria producing exopolysaccharides.....	121
18. Major functional groups of exopolysaccharides observed with FT-IR.....	130

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Structure of exopolysaccharides produced by <i>Rhodococcus</i> sp. 33.....	5
2. Structure of exopolysaccharides produced by <i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain S-2..	5
3. Structure of exopolysaccharides produced by <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4.....	6
4. Structure of exopolysaccharides produced by <i>Rhodococcus</i> sp. RHA1.....	6
5. Location of exopolysaccharides produced by microorganisms in the forms of slime and capsule.....	8
6. Chemical structures of levan and inulin.....	9
7. Chemical structures of β -D-glucans and cellulose	10
8. Chemical structures of curdlan and scleroglucan	11
9. Chemical structures of α -D-glucans, dextran and pullulan.....	12
10. The silicone plate.....	48
11. Percentage of specimens used for isolation of marine bacteria.....	52
12. Number of EPS producing marine bacteria isolated from SWM, YPM and ZMB media.....	54
13. Yield of exopolysaccharides produced by 20 selected isolates were cultivated in SWM, YPM and ZMB media.....	58
14. Phylogenetic tree analysis based on almost completed 16S rDNA gene sequence. Numbers within the phylogenetic tree indicate the percentages of occurrence of the branching order in 1000 bootstrapped trees. <i>T</i> is type strain.....	61
15. Morphology under microscopic view ($\times 100$) of (A) <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003, <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP070 and <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP071, (B) <i>B. subtilis</i> CNEP012, and (C) <i>P. ganghwensis</i> CNEP079. Arrows indicate spores. Bar, 10 μ m.....	62
16. Yield of EPS produced by selected isolates when cultivated in SWM, YPM and ZMB media.....	64

LIST OF FIGURES

Figure	Page
17. Thin layer chromatogram (TLC) of EPS samples (Lane 1: rhamnose, Lane 2: xylose, Lane 3: arabinose, Lane 4: fructose, Lane 5: mannose, Lane 6: galactose, Lane 7: glucose, Lane 8: hydrolysed EPS of <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003, Lane 9: <i>B. subtilis</i> CNEP012, Lane 10: <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP070, Lane 11: <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP071, Lane 12: <i>P. ganghwensis</i> CNEP079 and Lane 13: control YPM medium).....	66
18. Time course of cell growth and exopolysaccharides production obtained from <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 cultivated in YPM broth and incubated at 45 °C.....	68
19. Effect of carbon sources on cell growth, exopolysaccharides production by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.....	70
20. Effect of sucrose concentrations on cell growth, exopolysaccharides production by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.....	72
21. Effect of nitrogen sources on cell growth, exopolysaccharides production by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.....	73
22. Effect of yeast extract concentrations on cell growth, exopolysaccharides production by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h....	75
23. Effect of initial pH on cell growth, exopolysaccharides production by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.....	76
24. Effect of temperature on cell growth, exopolysaccharides production by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 for 96 h.....	78
25. Growth curve of <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 in YMG broth (pH 7.5, 45 °C) containing 60 g/l sucrose and 8.47 g/l yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively.....	79
26. Time course of cell growth, exopolysaccharides production, pH and residual sugar (a); product yield coefficient (Yp/x) and (Yp/s) (b); of <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 in YMG broth (pH 7.5, 45 °C) containing 60 g/l sucrose and 8.47 g/l yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively.....	83

LIST OF FIGURES

Figure	Page
27. Appearances of film prepared from exopolysaccharide produced by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 at concentrations of 2% (A), 3% (B), 4% (C) and 5% (D) with 20% glycerol.....	85
28. Appearances of film prepared from exopolysaccharide produced by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 at concentrations of 4% with 20% glycerol.....	89
29. Purification profile of exopolysaccharide from <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 on Sephadex G-100.....	90
30. GPC chromatogram of partially purified exopolysaccharides from <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003.....	91
31. Infrared spectrum of exopolysaccharides from <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003.....	92
32. The ¹ H NMR spectrum of exopolysaccharides from <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003 dissolved in D ₂ O.....	93
33. Thin layer chromatogram (TLC) of EPS samples (Lane 1: arabinose, Lane 2: glucose, Lane 3: hydrolysed EPS of <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003, Lane 4: mannose and Lane 5: xylose).....	94
34. HPLC chromatogram of exopolysaccharides produced by <i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003.....	96
35. Standard curve of protein by Lowry method.....	119
36. Standard curve of total sugar by phenol-sulfuric method.....	120
37. Standard curve of pullulan by Gel Permeation Chromatography.....	129
38. HPLC chromatogram of standard glucose sugar.....	131
39. HPLC chromatogram of standard mannose sugar.....	131
40. HPLC chromatogram of standard arabinose sugar.....	132
41. HPLC chromatogram of standard fructose sugar.....	132
42. HPLC chromatogram of standard galactose sugar.....	133
43. HPLC chromatogram of standard rhamnose sugar.....	133
44. HPLC chromatogram of standard xylose sugar.....	134
	(13)

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides: EPS) คือ สารประกอบโพลิเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) โปรตีน (proteins) หรือ ไขมัน (lipid) ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งที่เป็นโปรคาริโอต (ยูแบคทีเรียและอาร์คีแบคทีเรีย) และยูคาริโอต (ແພລັງก์ตอนพืช เชื้อราและจุลินทรีย์สาหร่าย) (Bhaskar *et al.*, 2005) โดยจุลินทรีย์จะสร้างหรือผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ในขณะที่มีการเจริญและขับออกมาภายนอกผนังเซลล์ในรูปของเมือก (slime) หรือยังคงติดอยู่กับเซลล์ในรูปของแคปซูล (capsules) (Schiano Moriello *et al.*, 2003) เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์จะมีชนิดหรือความหลากหลายสูงโดยเกิดจากลักษณะเฉพาะตัวและคุณสมบัติที่ต่างจาก โพลิแซคคาไรด์ที่มาจากพืชหรือสาหร่าย (Guezennec, 2002)

เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์มีความสำคัญและได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารที่ใช้เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์เพื่อช่วยในการปรับปรุงหรือเพิ่มเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารให้มีความเข้มข้นมากขึ้น (Gandhi *et al.*, 1997) เช่น แชนแทนกัมและเจลาแลนกัมที่ผลิตจาก *Xanthomonas campestris* และ *Pseudomonas elodea* ตามลำดับ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในพืช (plant pathogen) (Ludbrook *et al.*, 1997) แต่ผลิตภัณฑ์เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียนี้ก็ได้รับการยอมรับว่าสามารถนำมาใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม ลูกกวาด ซอส น้ำผลไม้และอาหารสัตว์ เป็นต้น นอกจากนี้อุตสาหกรรมยาได้นำเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์มาใช้เป็นสารป้องกันมะเร็ง ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและช่วยในการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (Vishal Shah *et al.*, 2000) เช่น เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KVS 20 และในอุตสาหกรรมทางการกำจัดสารพิษ เช่น เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ CNBP001 ที่แยกได้จากทะเลสาบสงขลา มีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่ว (จันทร์ทิพย์ คงสร, 2549) และเชื้อ *Pseudomonas maltophila*, *Staphylococcus aureus* ที่สามารถสะสมโลหะเงิน (Ag) ได้ (Brierley, 2000) ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหาเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในทะเลเพื่อนำไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์ได้

มากขึ้นจึงมีความน่าสนใจและเป็นไปได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมของทะเลมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตในทะเลมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ระดับความเค็ม ระดับความลึก กระแสน้ำในมหาสมุทรที่มีการหมุนเวียนเชื่อมต่อกันและกระแสน้ำขึ้นน้ำลง (Muralidharan *et al.*, 2002) ทำให้จุลินทรีย์ในทะเลมีพัฒนาการและระบบเมแทบอลิซึมที่ส่งผลต่อการอยู่รอดและการเจริญที่มีลักษณะเฉพาะตัว เช่นการสร้างสารขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเอง (chemical defense) ซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งในการอยู่รอด หรือการสร้างสารเคลือบที่เป็นเจลลาตินเพื่อรักษาความชื้นและป้องกันการระเหยของน้ำและมีการสร้างสารหุ้มตัวเพื่อช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดี (Pawlik, 1993) ทำให้โอกาสที่จุลินทรีย์ในทะเลสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากกว่าหรือมีองค์ประกอบที่ต่างจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่อยู่บนบก ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงการคัดเลือก คุณสมบัติและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเลที่ได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งมีอาณาเขตติดต่อกับทะเลมากที่สุดในประเทศไทย แต่ยังคงขาดการสำรวจถึงศักยภาพและความเป็นไปได้ในการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์เพื่อค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่น่าสนใจชนิดต่างๆ และนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มชีวภาพ

การตรวจเอกสาร

1. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides)

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คือ สารประกอบโพลีเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน หรือไขมันที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และอยู่ภายนอกเซลล์ เช่น *Pseudoalteromonas* sp. strain 721, *Alteromonas* sp. strain 1644 (Guezennec, 2002), *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2 (Makoto *et al.*, 2006) เป็นต้น โดยจุลินทรีย์จะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ขึ้นมาในขณะที่มีการเจริญและขับออกมาภายนอกผนังเซลล์ซึ่งจะมีลักษณะเป็นเมือก (slime) หรือยังคงติดอยู่กับเซลล์ในรูปของแคปซูล (Bhaskar *et al.*, 2005; Schiano Moriello *et al.*, 2003) โดยคาดว่าจุลินทรีย์ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เหล่านี้เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น เพื่อป้องกันเซลล์จากความแห้ง เช่น เจลลาตินที่มีคุณสมบัติในการรักษาความชื้นและป้องกันการระเหยของน้ำและมีการสร้างสารหุ้มตัวเพื่อช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดี (Pawlik, 1993) หรือเพื่อป้องกันตัวเองจากการถูกกิน (phagocytosis) โดยโปรโตซัวหรือเพื่อการยึดเกาะกับพื้นผิว โดยที่แคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์นี้จะประกอบไปด้วยเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จำพวกเด็คซทริน (dextrin) เด็คซ์แทรน (dextran) หรือลิแวน (levan) (Van den Berg *et al.*, 1993)

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์จะมีชนิดหรือความหลากหลายแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ โดยมีรายงานว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีน้ำตาลที่ต่างชนิดกันถึง 200 ชนิด (Linton *et al.*, 1991) จึงทำให้คุณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นมีความหลากหลายและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มาก ประกอบกับคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษ ไม่มีความแปรปรวนด้านปริมาณและราคา ทำให้การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีข้อได้เปรียบ อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ก็มีข้อด้อยคือ ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในขั้นตอนการหมักและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่จะเกิดจากค่าวัตถุดิบที่ใช้ในขั้นตอนการหมัก โดยคิดเป็นร้อยละ 30-80 ของค่าใช้จ่ายในการดำเนินการทั้งหมด เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันมีหลายชนิด และชนิดที่ผลิตในทางการค้า ได้แก่ แชนแทน เจลแลน เด็คซ์แทรน และพลูคูลแลน เป็นต้น (Table 1)

Table 1. Exopolysaccharides from bacteria with potential commercial application.

	Microbial Source	Reference
Commercially available		
Xanthan Gum	<i>Xanthomonas campestris</i>	Moreno <i>et al.</i> (2000)
Gellan Gum	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Banik <i>et al.</i> (2006)
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mariana <i>et al.</i> (2005)
Pullulan	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Forabosco <i>et al.</i> (2005)
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Grandpierre <i>et al.</i> (2007)
Baker's yeast glucan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stefan <i>et al.</i> (2003)
Bacterial alginate	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	Sawabe <i>et al.</i> (2007)
Bacterial cellulose	<i>Acetobacter xylinum</i>	Tatsuya <i>et al.</i> (2007)
Developed to large scale		
Scleroglucan	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Shrikant <i>et al.</i> (2005)
Chitosan	<i>Bacillus subtilis</i>	Theruvathil <i>et al.</i> (2007)
Polysaccharide-biosorbent	<i>Alcaligenes latus</i> B-16	Nohata and Kurane (1997)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Lin และคณะ (2007)

1.1 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

ส่วนใหญ่เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 2×10^6 ดาลตัน ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส ไซโลส และไรโบส เป็นต้น (Ko *et al.*, 2000) และโครงสร้างโดยทั่วไปจะประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์หลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) โดยที่โมเลกุลของน้ำตาลจะต่อกันแบบซ้ำๆ (repeating unit) ระหว่าง 3-7 หน่วย และเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่เหมือนหรือต่างกันได้ ในขณะที่จุลินทรีย์สกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็สามารถสร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันได้อีกด้วย (Linton *et al.*, 1991)

Makoto และคณะ (2006) ศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Rhodococcus* sp. 33 ที่แยกได้จากน้ำทะเลซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาล คือ D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-glucuronic acid และ pyruvic acid ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 ดังแสดงใน Figure 1

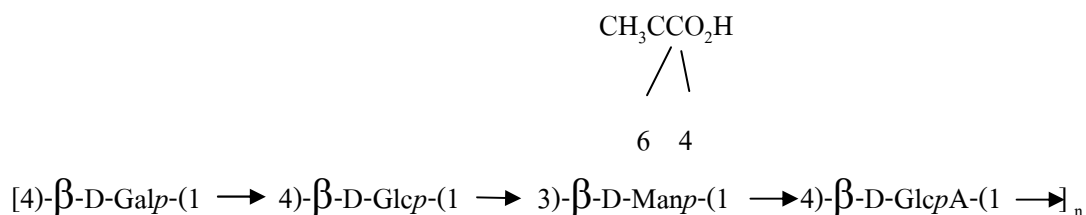


Figure 1. Structure of exopolysaccharides produced by *Rhodococcus* sp. 33

ที่มา: Makoto และคณะ (2006)

Makoto และคณะ (2006) ศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาล คือ D-galactose, D-mannose, D-glucose, D-glucuronic acid ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ดังแสดงใน Figure 2

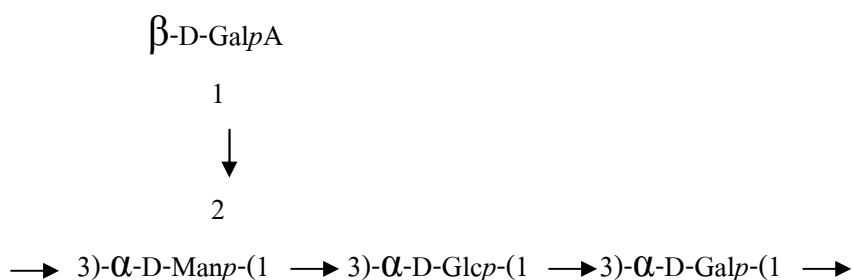


Figure 2. Structure of exopolysaccharides produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2

ที่มา: Makoto และคณะ (2006)

นอกจากนี้ Makoto และคณะ (2007) ยังได้ศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Rhodococcus erythropolis* PR4 ที่แยกได้จากน้ำทะเลซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาล คือ D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-glucuronic acid และ pyruvic acid ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 ดังแสดงใน Figure 3

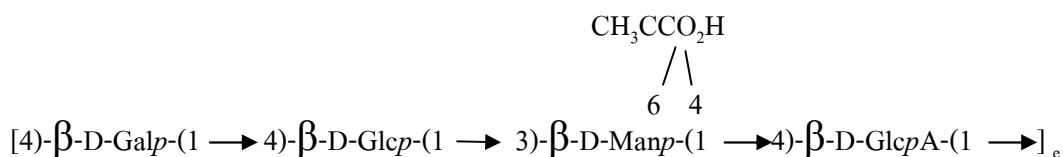


Figure 3. Structure of exopolysaccharides produced by *Rhodococcus erythropolis* PR4

ที่มา: Makoto และคณะ (2007)

Malcolm และคณะ (2007) ศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Rhodococcus* sp. RHA1 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบอินทรีย์ และพบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ดังกล่าวมีองค์ประกอบทางเคมี คือ D-glucuronic acid, D-glucose, D-galactose, L-fucose และ O-acetyl (Ac) ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 ดังแสดงใน Figure 4

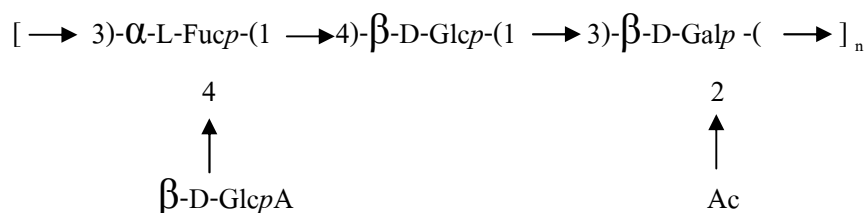


Figure 4. Structure of exopolysaccharides produced by *Rhodococcus* sp. RHA1

ที่มา: Malcolm และคณะ (2007)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงมวลโมเลกุลของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์และน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ด้วยกัน (Lin *et al.*, 2005) เช่น เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactobacillus casei* CG11 ที่เลี้ยงในอาหาร Basal Minimal Medium (BMM) ที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ หรือกลูโคสและซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ประกอบด้วยกลูโคสสูงถึง 76.8 หรือ 74.5 เปอร์เซ็นต์ และแรมโนส 13.4 หรือ 18.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่น้ำตาลชนิดอื่นจะพบในปริมาณที่น้อยมาก ในทางตรงกันข้ามเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactobacillus casei* CG11 ที่เลี้ยงในหางนม ประกอบด้วยกาแลคโตสถึง 55.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลูโคสจะพบในปริมาณเพียง 39.1 เปอร์เซ็นต์ (Kojic *et al.*, 1992)

Ludbrook และคณะ (1997) พบว่า *Streptococcus thermophilus* และ *Leuconostoc mesenteroides* ที่เจริญใน mESM broth ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีอากาศ และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 600 และ 530 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเติม whey protein 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. mesenteroides* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความหนืดของ fermentation broth จะเพิ่มขึ้นจาก 10.04 เป็น 39.82 cPs และ 10.15 เป็น 77.75 cPs ตามลำดับ

Calsteren และคณะ (2002) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* สายพันธุ์ RW-9595M และ R ในถังหมักที่มี basal minimum medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีกลูโคส หรือแลคโทส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิในการหมักที่ 32 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5×10^7 และ 2.1×10^7 ดาลตัน ตามลำดับ

Jayaraman และ Seetharaman (2002) ศึกษาคุณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Vibrio alginolyticus* ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล โดยการเลี้ยงในอาหาร Sea Water Nutrient (SWN) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6.39×10^6 ดาลตัน โดยมีองค์ประกอบคือน้ำตาลกลูโคส อะมิโนอะราบีโนส อะมิโนไรโบส และไซโลส ในอัตราส่วน 2:1:9:1

Kae และคณะ (2002) ศึกษาคุณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย จุลินทรีย์ 7 สายพันธุ์ คือ *Micrococcus luteus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Agrobacterium vitis*, *A. vitis* และ *Sulfitobacter pontiacus* ที่แยกได้จากน้ำทะเล โดยนำไปเลี้ยงในอาหาร YMG broth และบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 7 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 0.38 ถึง 25.19×10^4 ดาลตัน และมีองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไรโบส และไซโลส

Chi และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ที่ผลิตได้จาก *Cyanothece* sp. 113 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในทะเล โดยนำไปเลี้ยงในอาหาร F/2 medium ในถังหมัก พบว่า *Cyanothece* sp. 113 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ถึง 22.34 กรัมต่อลิตร ในเวลา 11 วัน ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส และเมื่อนำมาทำบริสุทธิ์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์พบว่าเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิด α -D-1,6-homoglucan ซึ่งเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่

1.2 การจัดจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

การจำแนกชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่ง โดยทั่วไปการแบ่งชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์อาจจะอาศัยเกณฑ์ดังนี้

1.2.1 จำแนกตามลักษณะการสร้าง โดยการสร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของเซลล์ ได้แก่ เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างภายนอกเซลล์ซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ ในรูปของเมือก เช่น เด็กซ์แทรน ที่ผลิตโดย *Leuconostoc mesenteroides* ที่สร้างออกมาอยู่นอกเซลล์ มีรูปร่างไม่แน่นอน มีลักษณะเหนียวหนืดและละลายน้ำได้ดีทำให้หลุดออกจากเซลล์ได้ง่าย และในรูปของแคปซูลที่ห่อหุ้มและเกาะติดอยู่กับผนังเซลล์ซึ่งจะมีความหนาและมีรูปร่างที่แน่นอน เช่น แคปซูลของ *Bacillus anthracis* (Bhaskar and Bhosle., 2005) ดังแสดงใน Figure 5

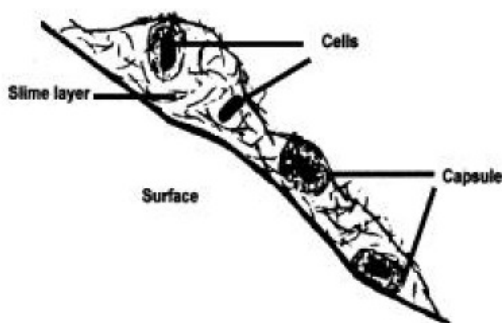


Figure 5. Location of exopolysaccharides produced by microorganisms in the forms of slime and capsule

ที่มา: Bhaskar และ Bhosle (2005)

1.2.2 จำแนกตามชนิดของโมโนเมอร์ (monomer) ที่เป็นองค์ประกอบ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้คือ

1.2.2.1 โพลีแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ โดยสารอินทรีย์ที่พบในโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ อะซิเตท ไพรูเวท ซักซินเนต และโพรพิโอเนต ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จะมีผลต่อประจุรวม (overall charge) บนโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์และนอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน ได้แก่ ซีรีนและกรดกลูตามิก ในโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดด้วย (Sutherland, 1995)

1.2.2.2 โพลีแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้บ่อยในโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ซึ่งจะเหมือนกับกรดไทโคอิก (teichoic

acid) โดยจะอยู่ในรูปของ phosphorylated exopolysaccharides ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากพบฟอสเฟตแล้วยังพบโพลีแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของซัลเฟตอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลด้วย (Sutherland, 1995)

1.2.2.3 โฮโมโพลีแซคคาไรด์ (Homopolysaccharides) เป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน โดยถ้าประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจะเรียกว่ากลูแคน (glucan) ในขณะที่หากมีฟรุกโทสเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่าฟรุกแทน (fructan) โดยเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลูแคนและฟรุกแทน ได้แก่ กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase; GTFs) และฟรุกโทสทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase; FTFs) ตามลำดับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวไม่เพียงแต่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เท่านั้นแต่ยังมีความสำคัญกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์อีกด้วย โดยปริมาณของโฮโมโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้นั้นจะขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย สภาพในการเจริญ และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะในการผลิตโฮโมโพลีแซคคาไรด์ (Korakli and Vogel, 2006)

ก. ฟรุกแทน (fructan) เป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ภายในสายโพลีเมอร์ประกอบด้วย ฟรุกโทสเพียงชนิดเดียว โดยแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ได้ คือ *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Weissella* (Monsan *et al.*, 2001) โดยในปัจจุบันฟรุกแทนที่ได้รับความสนใจในการศึกษานั้นเป็นอินนูลิน (inulin) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β -(2-1) และลิแวน (levan) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β -(2-6) ดังแสดงใน Figure 6

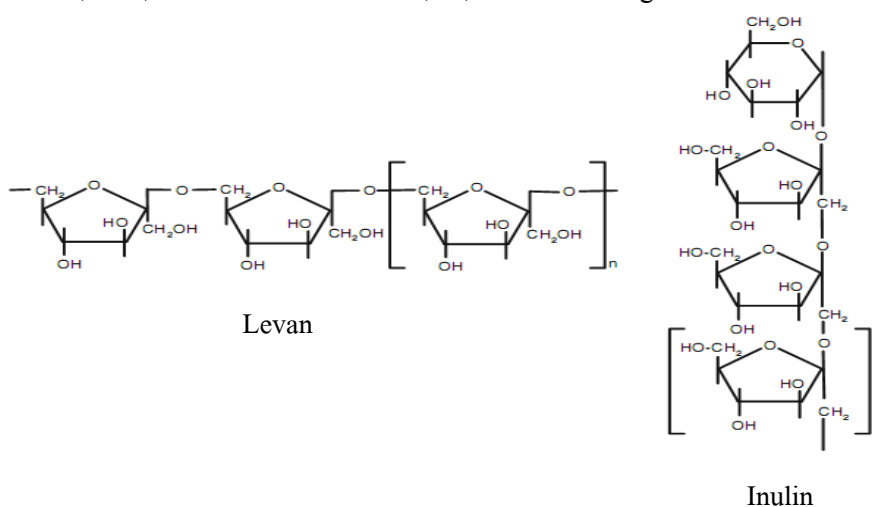
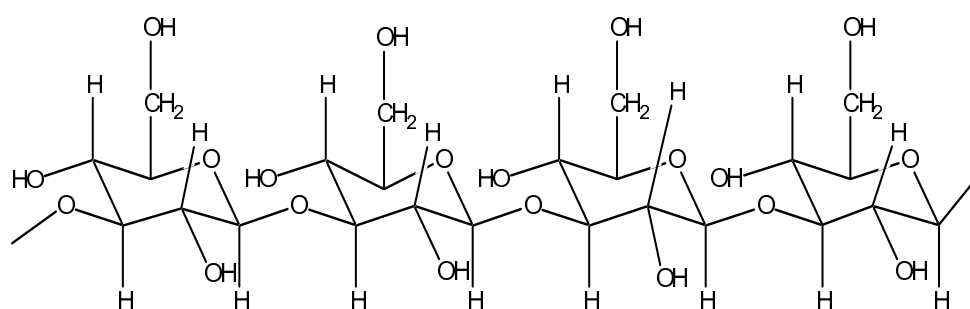


Figure 6. Chemical structures of levan and inulin

ที่มา: Korakli และ Vogel (2006)

ข. กลูแคน (glucan) เป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักสูงซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว โดยจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มกลูแคน ได้แก่ *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weisslla* และ *Lactobacillus* (Monsan *et al.*, 2001)

β -D-glucans เป็นกลุ่มของโมโนเมอร์ที่ต่อกันด้วย β -D-glucans เพียงอย่างเดียว (Figure 7) ประกอบไปด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เคอร์ดีแลน (curdlan) และสเครอโรกลูแคน (scleroglucan) (Table 2) โดยกลูแคนมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลักที่น้ำตาลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า เช่น โครงสร้างของเซลลูโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -D-glucan ส่วนเคอร์ดีแลนและสเครอโรกลูแคนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (1, 3)- β -D-glucan (Figure 8)



β -D-glucans

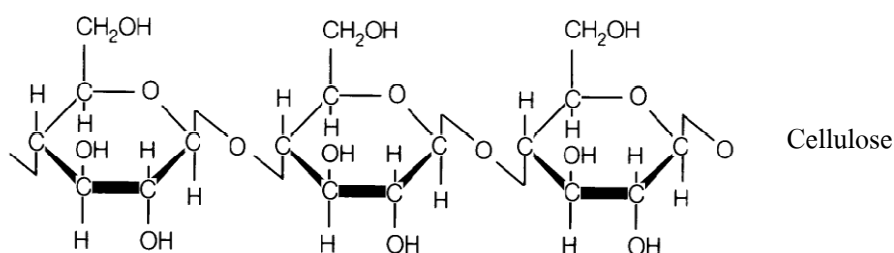


Figure 7. Chemical structures of β -D-glucans and cellulose

ที่มา: Gerald และ Tilak (1991), Sutherland (1998)

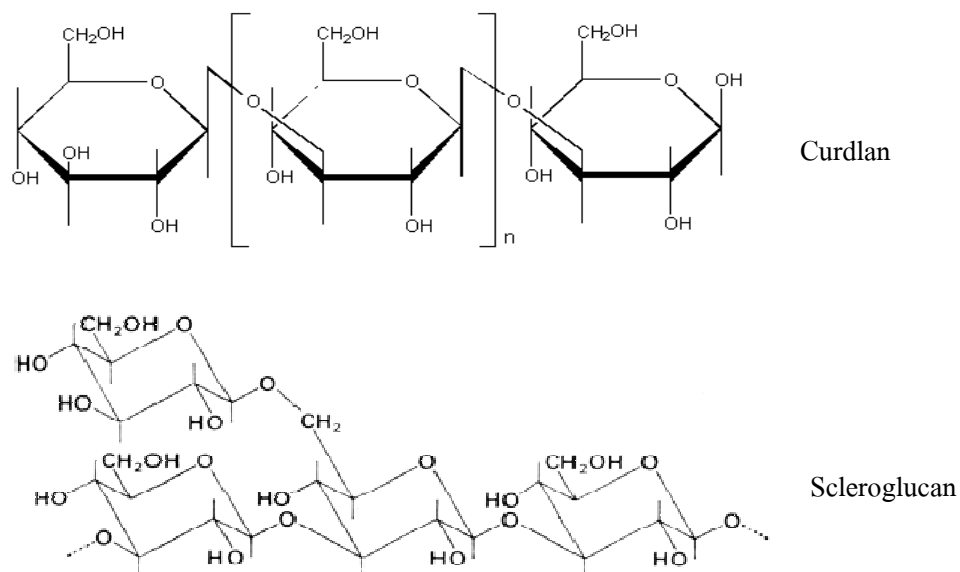


Figure 8. Chemical structures of curdlan and scleroglucan

ที่มา: Tada และคณะ (1998), Sletmoen และคณะ(2008).

Table 2. Types of biopolymers containing β -D-glucans.

Type	Microorganism	EPS structure	Reference
Cellulose	<i>Acerobacter</i> spp. , mainly gram – negative bacteria species and algae	1,3 - β -D glucan are linked together through β (1 \rightarrow 4) glycosidic bonds	Bertocchi <i>et al.</i> (1997)
Scleroglucan	Several fungi species	1,3 - β -D linked, attached to 1,6 - D glucosyl residues, relative molecular mass of about 1.3×10^5 Da	Sutherland (1990)
Curdlan	<i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> and <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>myxogenes</i>	1,3 - β -D glucans, relatively low-molecular mass polymer of 7.4×10^5 Da insoluble in water	Sutherland (1990)

α -D-glucans เป็นกลุ่มของโมโนเมอร์ที่ต่อกันด้วย α -D-glucans เพียงอย่างเดียว (Figure 9) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่เด็กซ์แทรน (dextran) เอลดีแนน (elsinan) พูลูลูแลน (pullulan) และ กรดซาลิสิก (sialic acid) (Table 3) โดยโครงสร้างของเด็กซ์แทรน จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1-6) และพูลูลูแลนจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1-4) และ α -(1-6) (Figure 9)

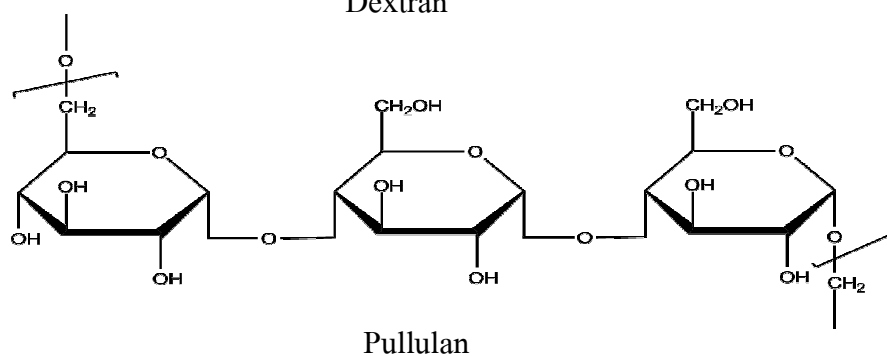
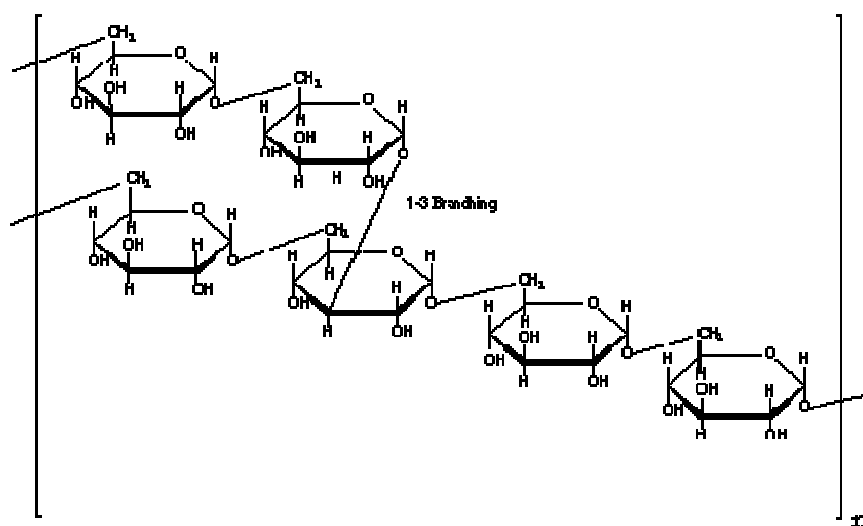
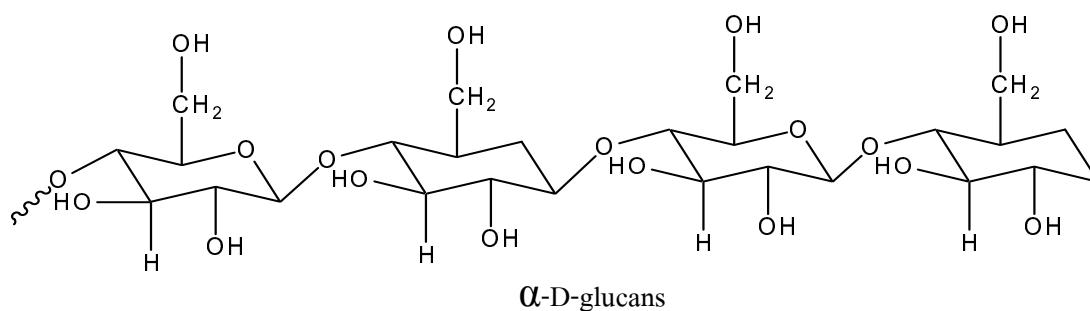


Figure 9. Chemical structures of α -D-glucans, dextran and pullulan

ที่มา: Donald และ Judith (2004), Cacic และคณะ (2002)

Table 3. Types of biopolymers containing α -D-glucans

Type	Microorganism	EPS structure	Reference
Dextrans	Several bacteria species	α -(1-6) linked D glucosyl residues, high molecular mass about $4-5 \times 10^7$	Shingel (2002)
Elsinan	<i>Elsinoe leucospila</i>	1,3- α maltotriose units linked, soluble in water, gels are formed at higher concentrations	Sutherland (1990)
Pullulan	Fungi	α -1,4- and α -1,6- glucan, connected by an α -1,4 glycosidic bond, high molecular mass 105-106 Da	Shingel (2002)
Sialic acid	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pasteurella haemolytica</i> , <i>Moraxella nonliquefaciens</i> and <i>Samonella</i> sp.	Generic term for the N- or O-substituted derivatives of neuraminic acid, a nine carbon monosaccharide, (2,9) linked	Revilla-Nuin (1998)

1.2.2.4 เฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (Heteropolysacchsrides) ได้แก่กลุ่มของโมโนเมอร์มากกว่าหนึ่งชนิดมาเชื่อมต่อกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 8 ชนิดได้แก่ แอลจินตที่ผลิตโดยแบคทีเรีย (bacterial alginates) อิมัลชันและโพลีแซคคาไรด์ที่เกี่ยวข้อง (emulsion and related polysaccharides) เจลแลน และพอลิเมอร์ที่เกี่ยวข้อง (gellan and related polymers) เฮปาริน (heparin) เอ็กซ์เอ็มซิกซ์ (XM6) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) ไรโซเบียม เฮทเทอโรโกลแลน (rhizobium heteroglycan) แซนแทน (xanthan) (Table 4)

Table 4. Types of biopolymers containing heteropolysaccharides.

Type	Microorganism	EPS structure	Reference
Bacterial alginates	Algal, <i>Azotobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	copolymer of (1-4)-linked β -D- mannuronic acid and its C(5) epimer, L- α -gluronic acid	Crescenzi (1995)
Emulsion and related polysaccharides	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Mainly of rhamnose, mannose, glucose and glucuronic acid. Several composed D - galactosamine aminouronic acid and amino sugar, molecular mass about 5×10^5 Da	Sutherland (1990)
Gellan and related polymers	<i>Auromonas elodea</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Monosaccharide of β -D- glucose, β -D-glucuronic acid and α -(1-4)-L rhamnose in molar ratios of 2:1:1, high molecular mass anionic polysaccharides	Nampoothiri (2000)
Heparin	<i>Escherichia coli</i> <i>serotype K 5</i>	Disaccharides repeating unit of 4 - β -D- glucuronosyl-1,4 α - N acetyl-D-glucosamine	Sutherland (1990)
XM6	<i>Enterobacter</i> stain XM6	Closely EPS from <i>Klebsiella aerogenes</i> type 54, composed of the same tetrasaccharides repeat unit	Sutherland (1990)

Table 4. (Continued)

Type	Microorganism	EPS structure	Reference
Hyaluronic acid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Disaccharide repeating unit, 1,4- β -linked disaccharides of D-glucuronosyl-1,3 β -N acetyl-D-glucosamine, high molecular mass size from 5,000 to 20,000,000, insoluble water	Crescen zi (1995)
Rhizobium Heteroglycan	Some species of <i>Rhizobium</i> , namely, <i>R. trifolii</i> , <i>R. meliloti</i> and <i>R. leguminosarum</i>	Heteropolysaccharide of D-glucose, D-galactose and D-mannose in the molar ratio 1: 3: 2, forming a hexasaccharide repeat unit, insoluble water	Sutherland (1996)
Xanthan	<i>Xanthomonas campestris</i>	Closely cellulose, the terminal β -D-mannosyl residue replaced by an L-rhamnosyl, high molecular mass about 4.7×10^7 Da	Sutherland (1996)

1.2.3 การจัดจำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโพลีแซคคาไรด์ (Moo-Young, 1985) สามารถจัดจำแนกได้ 3 ประเภท คือ

1.2.3.1 โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic หรือ acidic polysaccharide) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีกรดยูโรนิก กรดอินทรีซ์ หรือมีหมู่อะซีดิลเป็นองค์ประกอบ เช่น แชนแทน ซึ่งประกอบด้วย กรดกลูคูโรนิก ไพรูเวต หมู่อะซีดิล อยู่บนโมเลกุลนอกเหนือจากการมีน้ำตาลกลูโคส และแมนโนส นอกจากนี้ยังรวมถึงแอลแลนและอัลจินต เป็นต้น

1.2.3.2 โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียว เช่น ลีแวน พลูคูลแลน เค็ซแทรน สเตรโอโรกลูแคน ซึ่งมีหน่วยโมเลกุลคือ กลูโคส ไม่มีกรดยูโรนิก กรดอินทรีซ์ หรือหมู่อะซีดิลในโมเลกุล

1.2.3.3 โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic หรือ basic polysaccharide) โพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้มีการพบน้อยมากมักผลิตขึ้นโดยเชื้อรา โพลีแซคคาไรด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ ไคโตแซน ซึ่งเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด เช่น *Mucor rouxii*, *Mucorale spp.*, *Absidia coerulea* และ *Lentimus edodes* การมีประจุบวกบนโมเลกุลเนื่องจากมีหมู่อะมิโน

ชนิดของโพลีแซคคาไรด์และจุลินทรีย์ที่ผลิตโพลีแซคคาไรด์โดยการจัดจำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโพลีแซคคาไรด์ ดังแสดงใน Table 5

Table 5. Types of microorganism polysaccharides.

Microorganisms	Type of polymers	References
Bacteria		
Gram positive		
<i>Bacillus polymyxa</i>	Neutral polysaccharides	Lichtenhaler (1991)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Neutral polysaccharides	Kwon <i>et al.</i> (1996)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772	Neutral polysaccharides	Grobben <i>et al.</i> (1997)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RR	Neutral polysaccharides	Gassem <i>et al.</i> (1997)
<i>Bifodobacterium adolescentis</i> M 101-4	Anionic polysaccharides	Hosono <i>et al.</i> (1997)
<i>Bacillus</i> sp. DP-152	Anionic polysaccharides	Suh <i>et al.</i> (1997)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Neutral polysaccharides	Erring <i>et al.</i> (1994)
Gram negative		
<i>Alcaligenes cupidus</i> KT201	Anionic polysaccharides	Toeda and Kurene (1991)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Anionic polysaccharides	Jana and Ghosh (1997)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Anionic polysaccharides	Geddie and Sutherland (1993)
<i>Enterobacter</i> sp. BY-29	Anionic polysaccharides	Yokoi <i>et al.</i> (1997)
<i>Enterobacter</i> sp.	Anionic polysaccharides	Shimada <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas elodea</i>	Anionic polysaccharides	Ludbrook <i>et al.</i> (1997)
<i>Paecilomyces</i> sp. 1-1	Cationic polysaccharides	Takagi and Kadowaki (1985)
<i>Hansenula capsulata</i>	Anionic polysaccharides	Atkinson (1983)
<i>Hansenula holstii</i>	Anionic polysaccharides	Atkinson (1983)
Fungi		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Neutral polysaccharides	Madi <i>et al.</i> (1997)
<i>Pestalotiopsis</i> sp. KCTC 8637P	Anionic polysaccharides	Kwon <i>et al.</i> (1996)
<i>Lentinus edodes</i>	Cationic polysaccharides	Crestini <i>et al.</i> (1996)
<i>Aspergillus</i> sp. JS-42	Anionic polysaccharide	Nam <i>et al.</i> (1996)

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยแบคทีเรียมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องและส่งผลกระทบต่อปริมาณ ชนิดและองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งปัจจัยหลักเหล่านั้น ได้แก่

2.1 ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญและการผลิตโพลีแซคคาไรด์ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นๆ

การเลี้ยง *Lactobacillus casei* CG11 โดยการใช้น้ำตาลกาแลกโทส กลูโคส แล็กโทส ซูโครส มอลโทส และเมลลิไบโอส (mellibiose) ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ โดยน้ำตาลแล็กโทสและกาแลกโทสให้ผลผลิตต่ำที่สุด ในขณะที่กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เชื่อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 160 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าการเลี้ยง *L. casei* CG11 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบมากกว่า 86 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้แล็กโทสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียง 63 เปอร์เซ็นต์ (Cerning *et al.*, 1994)

Grobben และคณะ (1995) พบว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคส และพบว่าน้ำตาลกลูโคส มีปริมาณต่ำกว่า 18 กรัมต่อลิตร กลูโคสจะเป็นสารที่จำกัด (limiting substrate) การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Himanshu และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Bacillus megaterium* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส แล็กโทส และมอลโทส พบว่า *B. megaterium* ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีซูโครส คือ 9.20 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ กลูโคส มอลโทส ฟรุคโทส และแล็กโทส ตามลำดับ

Lee และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Bacillus polymyxa* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส กาแลกโทส แล็กโทส และสารละลายแป้งพบว่า *B. polymyxa* สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้

ชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของชูโครสที่ 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของชูโครสการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะเพิ่มขึ้นด้วย

การเลี้ยง *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 ในอาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ 94 มิลลิกรัมต่อลิตร การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะลดลงเมื่อใช้กาแลกโทส N-acetylglucosamine แลกโทส แมนโนส และฟรุกโทส โดยการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลงเหลือ 85, 56, 27, 23 และน้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ประกอบด้วย กลูโคส กาแลกโทส และแมนโนส ในอัตราส่วน 2.2:1:3:1 (Looijesteijin and Hugenholtz, 1999)

Concetta และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Bacillus aeolius* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากน้ำที่ได้จากน้ำพุร้อนในทะเล โดยใช้กลูโคสและชูโครสความเข้มข้น 0.6% เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด คือ 0.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

Tallon และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Lactobacillus plantarum* EP56 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ แลกโทส กาแลกโทส และชูโครส พบว่า *L. plantarum* EP56 ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีแลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้ต่ำที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้ฟรุกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน

Arskold และคณะ (2007) ศึกษาความเข้มข้นของชูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของชูโครสปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นด้วย และความเข้มข้นของชูโครสเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้น้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของชูโครสเป็น 100 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงถึง 3.4 กรัมต่อลิตร

Gokcen และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* G1 และ *Pseudomonas putida* G12 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส แมนโนส ฟรุกโทส และไซโลส พบว่าทั้งเชื้อ *P. aeruginosa* G1 และ *P. putida* G12 ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของไซโลสต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* G1 และ *P. putida* G12 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อใช้ไซโลสที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 368 และ 262 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากทั้ง 2 สายพันธุ์ไปวิเคราะห์

องค์ประกอบด้วยวิธี HPLC พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *P. aeruginosa* G1 มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบสูงถึง 99.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลอะมิโน 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากเชื้อ *P. putida* G12 มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณ 96.1 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำตาลอะมิโน เท่ากับ 3.9 เปอร์เซ็นต์

Zehra และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) และ *Streptococcus thermophilus* (W22) ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส และแลคโทส พบว่า *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) และ *S. thermophilus* (W22) ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูโคสที่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่า *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) และ *S. thermophilus* (W22) ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

2.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการสังเคราะห์เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Himanshu และคณะ (1997) ศึกษาความสามารถของ *Bacillus megaterium* ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมออกซาลेट แอมโมเนียมไนเตรต ไตรแอมโมเนียมซิเตรต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โซเดียมไนเตรต โพแทสเซียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า *Bacillus megaterium* ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 11.70 กรัมต่อลิตร

Degeest และ De Vuyst (1999) ศึกษาความสามารถของ *Streptococcus thermophilus* LY03 ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแลคโทส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนและยีสต์สกัดในอัตราส่วน 2.5:1 เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีกาแลคโทสและกลูโคสในอัตราส่วน 4:1 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนทำให้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง เนื่องจากอาหารและสภาวะแวดล้อมที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

Macedo และคณะ (2002) ทดลองนำหางนมมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M เพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าการใช้หางนมเป็น

แหล่งโตรเจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *L. rhamnosus* RW-9595M เนื่องจากมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนมากเกินไป

McKellar และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อส่วนประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Agrobacterium radiobacter* โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดร่วมกับเปปโตนและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อ *A. radiobacter* ผลิตได้มีกลูโคสและกาแลกโทสเป็นองค์ประกอบ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดร่วมกับเปปโตน แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อ *A. radiobacter* ผลิตได้มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบ และเมื่อศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมและไม่เติมยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ *A. radiobacter* ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมยีสต์สกัดได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมยีสต์สกัด

2.3 พิเอซของอาหารเลี้ยงเชื้อ

พิเอซที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะที่มีการควบคุมพิเอซ พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ (Van den Berg *et al.*, 1995) ซึ่งแบคทีเรียโดยทั่วไปต้องการการเจริญที่พิเอซที่แตกต่างกันเพราะฉะนั้นจึงส่งผลกระทบต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย โดยพิเอซที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่จะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Lee และคณะ (1997) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus polymyxa* โดยควบคุมพิเอซของการเลี้ยงที่ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 พบว่าที่พิเอซ 7 เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด และเมื่อพิเอซเพิ่มสูงขึ้นการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ก็จะลดลง อาจเนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อลดลงจึงทำให้การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อลดลง

Torino และคณะ (2001) ศึกษาผลของพิเอซต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Lactobacillus helveticus* ATCC15807 โดยควบคุมพิเอซของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4.5, 5.0 และ 6.2 พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดคือ 549 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พิเอซ 5.0 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลงเหลือ 49 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พิเอซ 6.2 นอกจากนี้พิเอซมีผลต่อองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้คือที่พิเอซ 6.2 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีน้ำหนัก

โมเลกุล 10^5 - 10^6 คาลตัน ซึ่งประกอบด้วย ฟอสเฟต 81 เปอร์เซ็นต์ มีกลูโคสและกาแลกโทสในอัตราส่วน 1:1 ในขณะที่พีเอช 4.5 และ 5.0 มีกลูโคสและกาแลกโทสในอัตราส่วน 2:1

Shu และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของพีเอชและปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากเชื้อ *Antrodia camporata* พบว่า พีเอชจะส่งผลถึงปริมาณและคุณภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย กล่าวคือ พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดย *Antrodia camporata* คือ พีเอช 5 และที่พีเอชต่ำจะทำให้มวลโมเลกุลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงขึ้นแต่ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จะมีปริมาณน้อย ส่วนที่พีเอชสูงจะมีผลต่อปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้สูงตามด้วย แต่กลับพบว่ามวลโมเลกุลที่ผลิตได้จะค่อนข้างต่ำ

Seo และคณะ (2004) เลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. CS101 ในถังหมักที่มี ซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.25 เปอร์เซ็นต์ และกรดคาซามิโน (casamino acid) 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ และปรับพีเอชของอาหารให้มีพีเอช 4 ถึง 8 พบว่าที่พีเอช 7 เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด

2.4 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Lactobacillus sakei* O-1 สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เท่ากับ 800 และ 450 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ลดลงเหลือ 200 มิลลิกรัมต่อกรัม และไม่มีการผลิตเลย ตามลำดับ เชื้อจะหยุดการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 42 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิในช่วง 30-42 องศาเซลเซียส เชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้น้อย ทำให้ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ลดลง (Degeest *et al.*, 2001)

Vuyst และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Streptococcus thermophilus* โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 352 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลงเหลือ 202 และ 325 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อไม่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Tallon และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Lactobacillus plantarum* EP56 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 18, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถ

ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 135.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 25 และ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จะน้อยลงคิดเป็น ร้อยละ 16 และ 24 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปจนถึง 37 องศาเซลเซียส ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ลดลงและน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ 18 องศาเซลเซียส ถึง 4 เท่า อาจจะเป็นเนื่องจากเมื่อเซลล์มีการเจริญที่ช้าลงการสังเคราะห์ผนังเซลล์ก็จะช้าลงตามลำดับ และปริมาณของ isoprenoid phosphate ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากขึ้น (Morin, 1998)

Seo และคณะ (2004) เลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. CS101 ในถังหมักที่มีซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.25 เปอร์เซ็นต์ และกรดคาซามิโน (casamino acid) 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ และใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด คือ 17.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ในถังหมัก

Aslim และคณะ (2005) พบว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* LY03 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ในขณะที่การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* B3, G12 และ *Streptococcus thermophilus* ที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

Khanafari และ Akhavan (2007) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Azotobacter chroococcum* 1723 โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเชื้อจะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียส

3. แนวทางการประยุกต์ใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

โพลีเมอร์ในกลุ่มเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้รับความสนใจอย่างมากทั้งในส่วนของ การนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพและทางด้านอุตสาหกรรม ตัวอย่างของโพลีเมอร์ประเภทเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ในด้านเสริมสร้างสุขภาพของมนุษย์ เช่น โพลีเมอร์จาก *Phellinus linteus* ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการลดปริมาณน้ำตาลในเลือด (Kim et al., 2001)

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิด (1,3)-D-glucans มีสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) เชื้อไวรัส (antiviral) และคุณสมบัติในการเร่งการสมานแผล (wound healing) (Bohn and Bemiller, 1995) นอกจากนี้โพลิเมอร์ชีวภาพชนิดอื่นๆ ที่มีสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น สภาวะแวดล้อม อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เป็นต้น ที่ทำให้ชนิดของโพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตขึ้นมา มีความแตกต่างกัน จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลายขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่น ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม สามารถนำมาใช้เป็นสารประกอบในการนำส่งยา (carrier) การบำบัดรักษาสิ่งแวดล้อม สามารถใช้เป็นสารตกตะกอน (flocculant) และทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ก็สามารถใช้ในการเพิ่มความคงตัวในอาหารให้มากขึ้น และสามารถใช้ในการขึ้นรูปเป็นบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น ดังแสดงใน Table 6 และ Table 7

Table 6. Polymers obtained from marine bacteria and their application

Types	Polymer	Potential applications	
1. Complex polysaccharides and related extracellular polymeric substance	1.1 adhesins	Under water surface coatings, bioadhesives	
	1.2 drag reducers	Drilling, ship efficiency	
	1.3 emulsion		Oil cleaning and viscosity reduction
		1.4 surfactant	Dispersing agent, grinding aid
	1.5 alginate	Food, textile	
	1.6 metal-binding EPS	Toxic-metals bioremediation	
2. Pigment	2.1 melanins	Biotechnology, reporter gene, cosmetics, dyes, colorings, sun screens	
3. Polyesters	3.1 poly 3 – hydroxyalkanoates (e.g. polyhydroxybutyrate)	Biodegradable plastics	

ที่มา : Weiner (1997)

Table 7. Established applications of microbial exopolysaccharides.

Properties	Use	Polymer
Biological properties:	Antitumor agents	β -D-glucan
	Eye and joint surgery	Hyaluronic acid
	Heparin analogues	<i>Escherichia coli</i>
	Wound dressings	Bacterial cellulose
Chemical properties:	Enzyme substrates	<i>Escherichia coli</i>
	Oligosaccharide preparation	Curdlan, pullulan
Physical properties:		
Emulsion stabilization	Food, Thixotropic paints	Xanthan
Fiber strength	Acoustic membranes	Bacterial cellulose
Film formation	Food coatings	Pullulan
Flocculant	Water clarification, Ore extraction	Various
Foam stabilization	Beer, Fire-fighting fluids	Xanthan
Gelling agents	Cell and enzyme technology	Gellan
	Food	Curdlan, Gellan
	Oil recovery (blockage of permeable zones)	Curdlan, Xanthan
Hydrating agent	Cosmetics, Pharmaceuticals	Hyaluronic acid
Inhibitor of crystal formation	Frozen foods, Pastilles and sugar syrups	Xanthan
Sheer thinning, viscosity control	Oil-drilling “muds”	Xanthan
Suspending agent	Food, Paper coatings,	Xanthan, Various,
	Agrochemical pesticides and sprays	Xanthan
Viscosity control	Jet printing	Xanthan

ที่มา: Sutherland (1998)

3.1 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็นโพลิเมอร์ที่มีความหนืดจึงได้นำคุณสมบัติดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้เป็นสารปรับปรุงผิวสัมผัสอาหาร รูปลักษณ์ภายนอก รสสัมผัส รสชาติ และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Broadbent *et al.*, 2003) ในปัจจุบันเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ dextran และ levan และแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ *S. thermophilus* และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Aslim *et al.*, 2005) ซึ่งอุตสาหกรรมที่มีการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มาใช้มากคือ อุตสาหกรรมนมหมัก เช่น นมหมักของชาวสแกนดิเนเวีย เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวสูงทั้งนี้เนื่องจากการใช้เชื้อเป็น *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถป้องกันการเกิด synergistic จึงช่วยในความคงตัวของผลิตภัณฑ์ นอกจากการผลิตโยเกิร์ตแล้วเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ยังมีความสำคัญกับการผลิตนมเปรี้ยว ชีส ครีมหมัก และขนมหวานที่ทำมาจากนม (Jolly *et al.*, 2002) นอกจากนี้ได้มีการศึกษานำเอาฟลูกลูแลนที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำฟลูกลูแลนมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มสำหรับห่อหุ้มอาหารแทนพลาสติก เนื่องจากตัวของฟลูกลูแลนสามารถที่จะย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ อีกทั้งยังได้มีการพัฒนานำเอา ฟลูกลูแลนมาเป็นตัวให้ความหนืดในผลิตภัณฑ์อาหารด้วย (Lin *et al.*, 2007) และโพลีแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารดังแสดงใน Table 8

Table 8. An applications of microbial exopolysaccharides in food industry.

Polysaccharides	Applications	References
Alginate	Yoghurt, ice cream, bakery, pudding, dessert gels, etc.	Weiner (1997)
Cellulose	Desserts, weight reduction thickeners, artificial meat, sausage and meat casings, etc.	Bertocchi <i>et al.</i> (1997)
Curdland	Heat-resistant gels, jellies, mayonnaises, etc.	Sutherland (1990)
Dextran	Baked foods, beverages, sweets, ice creams, fruit syrup, etc.	Whistler and Daniel (1990)
Pullulan	Airtight and edible film or foils, food coatings, etc.	Lin <i>et al.</i> (2007)
Xanthan	Pudding, soft drinks, alcoholic beverages and drinks, fruit beverages, fruit juice, jellies, canned foods, etc.	Sutherland (1998)

เด็กซ์เตรนเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเป็นชนิดแรก หลังจากทีค้นพบในปี 1880 และนำมาใช้ในการผลิตเจล (Crescenzi, 1995) ความแตกต่างของโครงสร้างทำให้เด็กซ์เตรนมีคุณสมบัติทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ จึงนำมาใช้ในการผลิตลูกกวาด หมากฝรั่ง และเจลลี่ เด็กซ์เตรนจะช่วยป้องกันการไหลเยิ้มของเจล ไอศกรีม และเป็นส่วนผสมในการทำขนมพุดดิ้ง (Whistler and Daniel, 1990)

แซนแทนกัมเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Xanthomonas campestris* ซึ่งก่อโรคในพืชแต่แซนแทนกัมได้รับการยอมรับให้สามารถนำมาใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม ลูกกวาด ซอส ขนมน้ำแข็ง น้ำผลไม้และอาหารสัตว์ หรือใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสีและอุตสาหกรรมสิ่งทอ ต้นทุนการผลิตแซนแทนกัมค่อนข้างถูกเนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้คือ กลูโคส และเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นโพลีเมอร์ได้สูงถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ (Sutherland, 1998)

3.2 การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

3.2.1 การป้องกันการเกิดมะเร็ง

Kitazawa และคณะ (1991) พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 สามารถยับยั้งมะเร็งชนิด Sacoma-180 ได้ เมื่อทดสอบโดยการฉีดเข้าช่องท้องของสัตว์ทดลองโดยการยับยั้งนั้นมีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเนื่องจากการยับยั้งจะได้ผลเมื่อทดสอบในหนูทดลองเท่านั้น โดยที่ไม่พบการยับยั้งเมื่อทดสอบในหลอดทดลอง

3.2.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีบทบาทในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (adjuvant) เช่น เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS 20 มีบทบาทในการเพิ่มการทำงานของ B-cell และเพิ่มการทำงานของ cytotoxic macrophage ได้ (Kitazawa *et al.*, 1993) เช่นเดียวกันกับเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495 ที่สามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในหนู นอกจากนี้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte macrophage และ cytokine ได้อีกด้วย (Laws *et al.*, 2001)

3.2.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียที่มีรายงานว่ามียุทธิต้านจุลินทรีย์คือ kefiran ซึ่งผลิตโดยกลุ่มของแบคทีเรียได้แก่ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* และ *Streptococcus* spp. และกลุ่มของยีสต์ได้แก่ *Kluyveromyces*, *Torula*, *Candida* และ *Saccharomyces*

sp. ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้มีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ เช่น *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Streptococcus* และ *E. coli* จากการทดลองของ Rodrigues และคณะ (2005) พบว่าเมื่อนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิด kefiran ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion โดยพบว่า *Staptococcus pyogenes* มีความไวต่อ kefiran มากที่สุด โดยรองลงมาเป็น *Stap. aureus*, *Stap. salivarius*, *Sal. typhimurium*, *C. albicans* และ *L. monocytogenase* ตามลำดับ ในขณะที่ *P. aeruginosa* และ *E. coli* มีความไวน้อยที่สุด โดยกิจกรรมการยับยั้งดังกล่าวมีค่า MIC และ MBC เป็น 462 และ 492 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นระหว่าง 450 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบนำ kefiran มาทำเป็นพลาสติกพบว่าสามารถลดขนาดของแผลในหนูทดลองได้มากกว่าชุดควบคุมซึ่งใช้ neomycin-clostol emulsion

3.2.4 การนำส่งยา

โพลีเมอร์ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมนั้นมีมากมายทั้งที่ใช้เป็นตัวยาสำคัญ (Active ingredients) เป็นส่วนประกอบในตำรับ (Pharmaceutical necessities) หรือใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ โพลีเมอร์ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมเช่น โคลดิน โคลโตเซน เด็กซ์แทรน เพคติน โดยส่วนมากนำมาใช้เป็นสารช่วยในตำรับยาต่างๆ โดยเป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยยาหรือให้ตัวยากออกฤทธิ์นาน สารก่อฟิล์ม สารก่อเจล บางตำรับสามารถทำให้ตัวยาละลายหรือแตกตัวได้ดีขึ้น รวมทั้งในระบบนำส่งยาแบบใหม่ได้แก่ ระบบนำส่งยาผ่านทางจมูก ตา ผิวหนังและระบบนำส่งยาสู่เป้าหมายโดยเตรียมในระดับอนุภาคขนาดเล็ก เช่น microspheres, nanoparticle เป็นต้นการเตรียมเป็น Bioadhesive เพื่อใช้ติดกับเนื้อเยื่อในสารต่างๆของร่างกาย (จุไรรัตน์ นันทานิช, 2546)

3.3 การประยุกต์ใช้เป็นสารดูดซับโลหะหนัก

การดูดซับโลหะหนักโดยวิธีทางชีวภาพในธรรมชาติได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้โพลีเมอร์เนื่องจากเป็นสารไม่เป็นอันตราย สามารถกำจัดออกได้ง่าย อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ร่วมกับการบำบัดน้ำในแหล่งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมก่อนปล่อยออกสู่แหล่งธรรมชาติ สารชีวภาพที่นิยมใช้ในการกำจัดโลหะหนักได้แก่ การใช้เซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา นอกจากนี้ยังอาจใช้สารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น โพลีแซคคาไรด์ การดูดซับโลหะหนักโดยใช้โพลีแซคคาไรด์เป็นการดูดซับแบบไม่ใช้พลังงาน เช่น โพลีเมอร์ชีวภาพจากแบคทีเรียในทะเลซึ่งแยกได้จากทะเลสาบสงขลา พบว่าเชื้อสายพันธุ์ CNBP001 มีความสามารถในการ

การดูดซับโลหะตะกั่วที่ความเข้มข้น 125 พีพีเอ็ม ได้ถึง 99.1 เปอร์เซ็นต์ (จันทร์ทิพย์ คงสร, 2549) และแบคทีเรียที่สร้างสารไซเดอโรฟออร์ (siderophores) ขึ้นมาซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความจำเพาะต่อการจับกับเหล็ก ทำให้แบคทีเรียสามารถที่จะเก็บเหล็กไว้ใช้ในการเมแทบอลิซึมต่อไป แบคทีเรียที่สามารถผลิตไซเดอโรฟออร์ได้ เช่น *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Azotobacter* และ *Arthrobacter* ส่วนโพลิเมอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียนั้นประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และ/หรือกรดนิวคลีอิก (Brierley, 2000) ซึ่งการจับกันของโลหะหนักกับโพลิเมอร์ชีวภาพนั้นจะขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบบนโพลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันจะประกอบไปด้วย pyruvate, phosphate, hydroxyl, uronic acid, sialic acid, glucuronic acid และกลุ่มของ carboxylate ซึ่งหมู่ดังกล่าวนี้จะมีกลุ่มของอิเล็กตรอนอยู่มากจึงส่งผลให้มีความหลากหลายในการจับกันของโลหะหนัก (Ford and Mitchell, 2000) โดยทั่วไปแล้วการจับกันของโพลิเมอร์ชีวภาพและโลหะจะอยู่ในรูปแบบ ionic และ electrostatic binding พบว่าแบคทีเรียที่สร้างโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีองค์ประกอบหลักเป็น acid polysaccharides จะจับกับโลหะหนักแล้วอยู่ในรูปของสะพานเกลือ (salt bridge) โดยทำให้การจับกับโลหะและเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีความแข็งแรง (Spaulding, 2004) แต่พบว่าโพลิเมอร์ชีวภาพที่ถูกสร้างขึ้นมาในสภาวะที่เป็นกลางนั้นจะมีกลุ่มของ anion มาทำหน้าที่ในการจับกับโลหะ และการจับกันของโลหะกับโพลิเมอร์ชีวภาพ จะเป็นพันธะอ่อนของ electrostatic bond จึงทำให้การจับกันนั้นไม่แข็งแรง (Geesey and Jang, 1989; Beech *et al.*, 1995) ทั้งนี้โพลิเมอร์จากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีตำแหน่งสำหรับจับโลหะหนักต่างกัน (Rud *et al.*, 1984) และมีประสิทธิภาพในการจับโลหะหนักแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน (Sripaoraya, 1993)

Salehizadeh และ Shojaosadati (2003) ศึกษาการดูดซับโลหะตะกั่วและทองแดง โดยใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* MS-105 ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่าใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้จากเชื้อ *B. firmus* สามารถดูดซับโลหะตะกั่ว ได้ถึง 98.3% ที่ pH 4.5 และสามารถดูดซับโลหะทองแดงได้ถึง 74.9% ที่ pH 4

3.4 การเกิดฟิล์ม (Film formation)

ฟิล์มมีองค์ประกอบหลักคือโพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งมีคุณสมบัติเกิดฟิล์มได้ โดยอาศัยตัวทำละลายและสารเจือปนที่เหมาะสม ซึ่งเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์ม ในการเตรียมฟิล์มเกี่ยวข้องกับแรง 2 แรงได้แก่ แรงโคฮีชัน (cohesion) เป็นแรงระหว่างโพลิเมอร์ด้วยกันเองจะเกิดขึ้นระหว่างการเกิดฟิล์ม ทำให้เกิดการเชื่อมตัวของผิววัตถุเดียวกันสร้างพันธะที่แข็งแรงซึ่งจะช่วยป้องกันหรือต้านทานการแยกออกจากกัน ปัจจัยที่มีผลต่อแรงโคฮีชันได้แก่ โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของโพลิเมอร์ ระบบการละลายและสภาวะในการเตรียม

ฟิล์ม โดยแรงโคฮีชันมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล ความสม่ำเสมอของโครงสร้างสายโซ่ การแผ่กิ่งก้านสาขา และการกระจายของกลุ่มที่มีขั้วบนสายโพลิเมอร์ คือสายโพลิเมอร์ที่ยาวจะทำให้เกิดการยึดเกาะกันได้ดี การกระจายของกลุ่มขั้วอย่างมีระเบียบในสายโพลิเมอร์จะช่วยให้เกิดพันธะไฮโดรเจนและพันธะไอออนิกระหว่างสายโซ่ ทำให้มีความแข็งแรง การละลายของโพลิเมอร์ในการเตรียมฟิล์มยังมีผลต่อแรงโคฮีชัน คือถ้าโมเลกุลของโพลิเมอร์ละลายหรือขยายตัวได้มากที่สุดจะได้โครงสร้างซึ่งเชื่อมกันด้วยแรงโคฮีชันที่มาก ฟิล์มที่ได้มีความแข็งแรง ส่วนแรงอีกชนิดหนึ่งคือแรง แอดฮีชัน (adhesion) เป็นแรงระหว่างโมเลกุลของโพลิเมอร์กับสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมฟิล์ม ทำให้เกิดโครงสร้างของฟิล์มได้ เช่น แรงระหว่างโมเลกุลของโพลิเมอร์กับพลาสติกไซเซออร์ ซึ่งจะมีผลต่อคุณสมบัติต่างๆของฟิล์มเช่นกัน สารที่ใช้เป็นพลาสติกไซเซออร์ควรเป็นสารที่ไม่ระเหยง่าย มีจุดเดือดสูงและไม่เกิดการแยกตัวภายหลังการเติม ดังนั้นพลาสติกไซเซออร์ที่เลือกใช้ควรเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ความดันไอต่ำ และอัตราการแพร่ต่ำ เพื่อป้องกันการแยกตัวออกขณะระเหยตัว ทำละลายออกจากสารละลายโพลิเมอร์ นอกจากนี้ที่สำคัญ คือ พลาสติกไซเซออร์ที่นำมาเติมในสารละลายโพลิเมอร์จะต้องละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายโพลิเมอร์นั้น (Babker, 1996) เนื่องจากพลาสติกไซเซออร์จะไปลดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสายโพลิเมอร์เพิ่มช่องว่างระหว่างโมเลกุลและโมเลกุลสามารถเคลื่อนที่ได้มากขึ้น ดังนั้นจึงสามารถลดลักษณะที่เปราะของฟิล์ม โดยเพิ่มลักษณะการยืดหยุ่น โค้งงอ ทำให้ฟิล์มจับกันเป็นแผ่น เพิ่มการยึดตัวของฟิล์ม แต่พลาสติกไซเซออร์ทำให้การต้านทานแรงดึงขาดลดลงและทำให้สมบัติความต้านทานต่อก๊าซและไอน้ำของฟิล์มลดลง (Guilbert *et al.*, 1996) ตัวอย่างพลาสติกไซเซออร์ที่นิยมใช้ในการเตรียมฟิล์มได้แก่ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล เป็นต้น

Kim และคณะ (2002) ได้ศึกษาสมบัติเชิงกล (ความทนแรงดึง, เปอร์เซ็นต์การยืดตัว) การซึมผ่านของไอน้ำ และการละลายของฟิล์มจากแป้งที่มีคาร์บอกซิลิกสูง โดยใช้พลาสติกไซเซออร์ คือ ซอร์บิทอล ไชลิตอล แมนนิทอล และกลีเซอรอล พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ซอร์บิทอล ไชลิตอล แมนนิทอล ทำให้ความทนแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ไชลิตอล แมนนิทอล และกลีเซอรอล ทำให้ค่าการซึมผ่านของไอน้ำลดลง การเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ทำให้ค่าการละลายของฟิล์มลดลง

3.4.1 สมบัติทางกายภาพ

เป็นสมบัติที่แสดงถึงลักษณะภายนอกที่มองเห็น เช่น สี ลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม ความหนา เป็นต้น ซึ่งความหนาหมายถึง ระยะตั้งฉากระหว่างผิวหน้าทั้งสองของฟิล์มมีหน่วยเป็นไมโครเมตรหรือมิลลิเมตร ความหนามีส่วนสัมพันธ์กับสมบัติอื่นๆ เช่น ความต้านทานแรงดึงขาด (Guilbert, 1986) ซึ่งวิธีการตรวจสอบความหนานิยมใช้ไมโครมิเตอร์ในการตรวจวัด

3.4.2 สมบัติทางกล

3.4.2.1 ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) คือ ค่าความเค้นที่ใช้ในการดึงฟิล์มที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของแผ่นทดสอบที่ความกว้างคงที่จนแผ่นฟิล์มนั้นขาดภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด มีหน่วยเป็น N/m^2 ค่านี้ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะระหว่างสายโซ่โพลิเมอร์ มากกว่าความแข็งแรงของสายโซ่โพลิเมอร์ (Guilbert, 1986)

3.4.2.2 การยืดตัว (elongation) คือ ร้อยละของระยะทางที่ฟิล์มยืดออกด้วยแรงดึงจนขาดต่อความยาวเดิม ถ้าความยาวของฟิล์มน้อย ฟิล์มมีลักษณะเปราะและไม่ยืดหยุ่น การเติมพลาสติกไซเซอร์ลงในโครงสร้างตาข่ายนอกจากจะทำให้ค่าความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มลดลง ยังมีผลทำให้ความยืดหยุ่นของฟิล์มเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากพลาสติกไซเซอร์ทำให้ความแข็งแรงของพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุลลดลง ส่งผลให้สายโซ่โพลิเมอร์เคลื่อนที่ได้มากขึ้น (Guilbert, 1986)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยก และคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
2. เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA
3. เพื่อศึกษาสภาวะการเลี้ยงแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้ที่ทำให้มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุด
4. เพื่อศึกษาคูณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสมในการนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม
5. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ขอบเขตงานวิจัย

แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ จากตัวอย่างที่เก็บได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการเปรียบเทียบปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อแต่ละไอโซเลตผลิตขึ้น จากนั้นนำแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มาจัดจำแนกชนิด โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้ ศึกษาเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุดิบ

1.1 ตัวอย่างที่มีฟิล์มชีวภาพเกาะอยู่จากชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างรวมทั้งหมด 5 แห่ง ได้แก่ แหล่งที่ 1 ทะเลน้ำพุร้อน อำเภอลองท่อม จังหวัดกระบี่ แหล่งที่ 2 สุสานหอย จังหวัดกระบี่ แหล่งที่ 3 อุทยานอ่าวพังงา จังหวัดพังงา แหล่งที่ 4 หาดปากเมง จังหวัดตรัง และแหล่งที่ 5 สะพานสารสิน จังหวัดภูเก็ต โดยตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และควรนำมาแยกเชื้อให้เร็วที่สุด ภายใน 24 ชั่วโมง

1.2 น้ำทะเลธรรมชาติ จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ.เมือง จ.สงขลา

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกเชื้อที่ผลิตเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์จากตัวอย่างที่เก็บได้จากทะเล

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone medium; YPM (ดัดแปลงมาจาก Shivakumar and Vijayendra, 2006) ประกอบด้วยซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Seawater medium; SWM (ดัดแปลงมาจาก Jayaraman and Seetharaman 2002) ประกอบด้วยเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 10 กรัมต่อลิตร

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell marine broth; ZMB (ดัดแปลงมาจาก Kae *et al.*, 2002) ประกอบด้วยเปปโตน 1 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร

3. อุปกรณ์

3.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd

3.2 เครื่องเขย่า (Shaker)

- 3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น SCR20B บริษัท Hitachi
- 3.4 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) รุ่น 420A บริษัท Orion
- 3.5 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation
- 3.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 5403 บริษัท Eppendorf
- 3.7 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- 3.8 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven) รุ่น MOV.212 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd
- 3.9 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
- 3.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210s บริษัท Satorius
- 3.11 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- 3.12 เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น OSB 2000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd
- 3.13 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ บริษัท MERCK ประเทศเยอรมนี
- 3.14 กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Nikon
- 3.15 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield Digital Viscometer) รุ่น DV-I บริษัท S.V. Medico Co., Ltd
- 3.16 เครื่องทดสอบความแข็งแรงของวัสดุ (universal testing machine LLYOD รุ่น 30 KN)

4. สารเคมี

- 4.1 เปปโติน (Analytical grade) บริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย
- 4.2 ยีสต์สกัด (Analytical grade) บริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย
- 4.3 เนื้อสกัด (Analytical grade) บริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย
- 4.4 ไดคลอโรโรมีเทน (Analytical grade) บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 4.5 อะซิโตนไนโตรด (Analytical grade) บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 4.6 กรดอะซิติก (Analytical grade) บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 4.7 ซูโครส (Commercial grade) บริษัท มิตรผล จำกัด ประเทศไทย
- 4.8 กลูโคส ไฮโดรส แลกลโทส กาแลคโตส แรมโนส (Analytical grade) บริษัท Univar ประเทศออสเตรเลีย

- 4.9 น้ำ DI (Deionized water)
- 4.10 กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid; TFA)
- 4.11 โซเดียมอะซิเตด (Analytical grade) บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 4.12 เอทานอล 95% (Commercial grade) บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 4.13 สารเคมีสำหรับย้อมแกรม
- 4.14 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข)
- 4.15 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก ข)

6. วัสดุ

- 6.1 ถุงไดอะไลซิสขนาด molecular weight cut off 8,000 ดาลตัน (Membrane Filtration Products, Inc. USA)

วิธีการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่สามารถผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้

1.1 การเก็บตัวอย่างจากทะเล

ทำการเก็บตัวอย่างชนิดต่างๆ จากทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเลือกเก็บตัวอย่างที่มีฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) เกาะอยู่ ซึ่งสังเกตได้จากตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นเมือกเกาะติดอยู่ ทั้งหมด 5 แห่ง ได้แก่ แหล่งที่ 1 ทะเลน้ำพุร้อน อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ แหล่งที่ 2 สุสานหอย จังหวัดกระบี่ แหล่งที่ 3 อุทยานอ่าวพังงา จังหวัดพังงา แหล่งที่ 4 หาดปากเมง จังหวัดตรัง และแหล่งที่ 5 สะพานสารสิน จังหวัดภูเก็ต และเก็บตัวอย่างไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทใส่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งก่อนการแยกเชื้อแบคทีเรียตามข้อ 1.2

1.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ในระดับเบื้องต้นบนอาหารแข็ง

ทำการนำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อเพื่อล้างเอาสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออกจากตัวอย่าง จากนั้นทำการตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ หรือขูดเอาเฉพาะฟิล์มชีวภาพที่เกาะอยู่บนตัวอย่างไปทำการไฮโมจิไนซ์ในน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} นำมาแยกเชื้อโดยการ spread plate ตัวอย่างลงบนอาหาร YPM, SWM และ ZMB โดยตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และตัวอย่างจากแหล่งที่ 2, 3, 4 และ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) จนสังเกตเห็นลักษณะโคโลนีที่มีเมือกเยิ้มหรือยึดเป็นสายเมื่อใช้ลูป (loop) และที่ผิวของโคโลนีแล้วตั้งขึ้น (Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilan, 2005) นำโคโลนีดังกล่าวมา streak ซ้ำ 2-3 ครั้ง บนอาหารที่คัดแยกเชื้อได้จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการย่อยแกรมตามวิธีของ Hucker stringing method (Murray *et al.*, 1994) เก็บเชื้อที่ได้ในกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ในเชิงปริมาณ

1.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร

ที่มีอาหารเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.3.2 การเปรียบเทียบปริมาณเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียจากทะเลผลิตได้

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.3.1 มาปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แยกเชื้อได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์

ปริมาณเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์ โดยนำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสารละลายส่วนใสและตัวเซลล์ออกจากกัน นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) 1 ครั้งเพื่อล้างเกลือออก แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักจะคงที่ นำส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเอทานอลที่เข้มข้นในอัตราส่วน 1 : 2 (v/v) (สารละลายส่วนใส : เอทานอล) ทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเอทานอลและเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ออกจากกัน จากนั้นนำเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ที่ได้ไปละลายในน้ำที่ปราศจากไอออนแล้วตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลที่เข้มข้น เพื่อให้ได้เอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (ดัดแปลงจาก Sinha *et al.*, 2001) จากนั้นนำเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เพื่อคำนวณน้ำหนักแห้งของเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ที่ได้ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ในหน่วยของกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อจัดลำดับศักยภาพของเชื้อที่สามารถผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ } (Y_{p/x}) = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิต (P)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ (X)}}$$

เลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงที่สุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

1.3.3 การเปรียบเทียบปริมาณเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากจากทะเลที่คัดเลือกได้

1.3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.3.3.2 การเปรียบเทียบปริมาณเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียจากทะเลผลิตได้

นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 1.3.3.1 มาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงที่สุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

2. การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิต EPS โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่า มีศักยภาพการผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ จากข้อ 1.3.2 มาจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Nakagawa และคณะ (2001)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Preparation of DNA using Promega Kit) ตาม Protocol ของ Wizard Genomic DNA Purification Kit

ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000-16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำเซลล์ที่ได้จากการตกตะกอนมาละลายใน 50 ไมโครลิตร EDTA ปริมาตร 480 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม Lytic enzyme ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000-16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมนuclei lysis solution ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง จึงเติมนRNase solution ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 2-5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-60 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง เติมนสารละลายสำหรับการตกตะกอนของโปรตีน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่อง Vortex ที่ความเร็วสูง 20 วินาที บ่มในน้ำแข็ง 5 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000-16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนสารละลายมาเติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000-16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน 70 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล เขย่าแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000-16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายหรือส่วนใสทิ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที เพื่อระเหยเอทานอลออก จากนั้นเติมน DNA rehydration solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 โดยวิธีการใช้ Agarose gel electrophoresis ซึ่งจะเริ่มจากการเตรียม อะกาโรสเจล (agarose gel) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัว (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดึงหัวออก จากนั้นผสมจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 กับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5 : 2 (v/v) แล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล นำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ (Volt) นาน 45-50 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

2.3 การเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 มาเพิ่มปริมาณโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยดัดแปลงวิธีจาก Kae และคณะ (2002) และ Jian และคณะ (2007)

การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ 16S rDNA ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อที่ผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ ซึ่งสกัดได้จากวิธีในข้อ 2.1 เป็นแม่แบบ (DNA template) โดยทำการเติมส่วนผสมต่างๆ ที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR เรียงลำดับดังแสดงใน Table 9 จากนั้นผสมรีเอเจนต์ต่างๆ ให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ใน microAmp reaction tube ให้ได้ปริมาณเท่าๆ กัน

เติมดีเอ็นเอที่สกัดได้ลงไป 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยมีสภาวะการทำงานของเครื่องดังแสดงใน Table 10

Table 9. Reagents for PCR

Reagent	Volume (μ l)
10x Taq buffer	5
25 mM MgCl ₂	4
20 mM dNTP	1
0.2 μ M Primer 1	1
0.2 μ M Primer 2	1
distilled water	26.75
Taq polymerase (TaKaRa) (5U / μ l)	0.25
DNA template	10
Total	50

Remark: Primer 1: Forward primer is 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')

Primer 2: Reverse primer is 1518R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')

Table 10. Condition of PCR

Reaction	Temperature	Time	Cycle
Denaturing	94°C	2 min	} 30
	94°C	10 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
	68°C	2 min	
Extension	72°C	10 min	

2.4 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ทำการตรวจสอบยีนที่มีขนาด 1,500 เบส โดยเตรียมอะกาโรสเจล ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัว (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็ง

ตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดึงหรือออก จากนั้นผสม PCR product ที่ได้จากข้อ 3.3 กับสปีดิตตามในอัตราส่วน 5:2 (v/v) แล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล นำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลแอมเบอร์โดยใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 45-50 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอซีเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.5 การทำบริสุทธิ์ของ amplified PCR products โดยใช้ GFX PCR DNA และ Gel Band Purification Kit ตาม Protocol ของ GE Healthcare

นำ GFX column ใส่ใน collection tube เติม capture buffer 500 ไมโครลิตร ลงไปใน GFX column ถ่าย amplified PCR products (ประมาณ 100 ไมโครลิตร) ใส่ลงใน GFX column ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต ดูดขึ้นลง 4-6 ครั้ง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที นาน 30 วินาที นำส่วนที่แยกได้ในหลอด collection tube ทิ้งไปล้างโดยเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน GFX column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที นาน 30 วินาที นำส่วนของ collection tube ทิ้งไป นำส่วน GFX column ไปใส่ใน 1.5 มิลลิลิตร microtube อันใหม่ เติม TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในส่วนของ GFX column บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที ก็จะ得上ส่วนของยีน 16S rDNA บริสุทธิ์อยู่ใน microtube (ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ตามวิธีในข้อ 2.4)

2.6 การหาลำดับเบสของ 16S rDNA (Sequencing of PCR amplified 16S rDNA)

นำ amplified PCR products ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA โดยส่งตัวอย่างชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ MacroGen Incorporation ประเทศเกาหลี) แล้วนำลำดับเบส 1500 bp ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 ไพรเมอร์ มาต่อกันด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall *et al.*, 1999)

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.7.1 นำชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส (Blast) ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

2.7.2 สร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Clustal X และ NJ plot

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 2.7 มาทำการจัดจำแนกเชื้อ โดยจะพิจารณาว่าเป็นเชื้อก่อโรคหรือเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีอาการมาก่อนหรือไม่ โดยการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลต่างๆ จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่จัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3. คัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์โดยการเปรียบเทียบปริมาณ ชนิดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น และความหนืดของเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียจากทะเลผลิตได้

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3.3 มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

3.2 การเปรียบเทียบปริมาณเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ SWM, YMG และ ZMB ที่แบคทีเรียจากทะเลผลิตได้

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SWM, YPM และ ZMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้จากข้อ 1.2 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ (Y_p/x) ตามข้อ 1.3.2

3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบและชนิดของเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียจากทะเลผลิตขึ้นด้วยวิธีการโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) (Lato *et al.*, 1968)

ทำการเตรียมแผ่น TLC ชนิด normal phase โดยนำแผ่น TLC ลงไปแช่ใน 0.2 โมลาร์ของโซเดียมอะซิเตทให้อิ่มตัว เพื่อช่วยในการปรากฏตำแหน่งของน้ำตาลให้มีความชัดเจนและรวดเร็ว นำเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากข้อ 3.2 มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 1 เดิม TFA (trifluoroacetic acid) ความเข้มข้น 2M ในอัตราส่วนระหว่างสารละลายเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์และสารละลาย TFA เป็น 1:1 (v/v) จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยที่สมบูรณ์ จากนั้นทำการเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานโดยนำน้ำตาลแต่ละชนิด (กลูโคส ไซโลส แลคโตส กาแลคโตส แรมโนส แมนโนส และ อะราบีโนส) ซึ่งเป็นน้ำตาลมาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบมา 10 มิลลิกรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ชนิดของเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์โดยการหยดสารละลายเอ็กซ์โพลีแซคคาไรด์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดสมบูรณ์แล้ว และสารละลาย

น้ำตาลมาตรฐานที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ นำแผ่น TLC จุ่มลงไปในตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย Dichloromethane : Acetonitrile : Acetic acid : water ในอัตราส่วน 5: 3: 3: 1.5 (v/v) แล้วใช้ anisaldehyde สำหรับเป็น spraying reagent (ภาคผนวก ข) ในการตรวจสอบองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Schulz *et al.*, 1991) โดยที่หลังจากสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลายนี้แล้วจะปรากฏวง (spot) บนแผ่น TLC ตามชนิดของสารหลังจากให้ความร้อน 105 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที หลังจากนั้นทำการวัดระยะทางที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ เพื่อคำนวณและเปรียบเทียบค่า R_f ที่คำนวณได้กับตัวอย่างน้ำตาลมาตรฐาน โดยการคำนวณค่า Retention factor (R_f) จะใช้สมการ ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สาร (compound) เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ ตัวทำละลาย เคลื่อนที่ (solvent front)}}$$

3.4 การวัดความหนืดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียจากทะเลผลิตได้

ทำการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อแต่ละไอโซเลตผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ spatula คนจนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ละลายหมดได้เป็นสารละลายเนื้อเดียว แล้ววัดความหนืดโดยใช้ Brookfield Digital Viscometer (ภาคผนวก ข) (Aslim *et al.*, 2006)

เลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ให้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีความหนืดสูงที่สุด ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบและ/หรือผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

4. การหา Time course ของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

4.2 การหา Time course ของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่เวลาดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

5.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แล็กโทส และโมลาส นำแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ข) มาใช้โดยให้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 โดยมีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อ

นาที่ ตามเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.3 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่มีชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัด เนื้อสกัด เปปโตน เปปโตนร่วมกับยีสต์สกัด และแอมโมเนียมไนเตรด นำแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมาใช้โดยให้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 8.47 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่มีชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 โดยมีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8.47, 10 และ 12 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.5 ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่มีชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ และชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 และ 5.4 ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำมาปรับพีเอชให้ได้ 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 บ่มไว้ในอุณหภูมิที่คัดเลือกเชื้อได้จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.6 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่มีชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 และ 5.4 ตามลำดับ และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์จากข้อ 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, อุณหภูมิห้อง (30 ± 3), 45 และ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตามเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 นำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ตามข้อ 1.3.2

เลือกอุณหภูมิที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

6. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่เหมาะสม

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่มีชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 และ 5.4 ตามลำดับ และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์จากข้อ 5.5 ปริมาตร 100

มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.6 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 และ 240 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่เวลาดังกล่าวมาวิเคราะห์

6.1 พีเอชโดยใช้พีเอชมิเตอร์

6.2 การเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

6.3 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Lowry *et al.*, 1951) โดยนำน้ำหมักมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จากนั้นนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ด้วยวิธี Lowry (ภาคผนวก ข)

6.4 การตรวจนับเชื้อทั้งหมด โดยวิธี plate count โดยนำตัวอย่างในแต่ละเวลามาทำการเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำตัวอย่างที่ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมมา 0.1 มิลลิลิตร spread plate ลงบนอาหารที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 5 นำไปบ่มในอุณหภูมิที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 5.6 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีที่ปรากฏขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำนวนโคโลนีจะต้องอยู่ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนีต่อจาน (plate) และทำการคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดในหน่วยของ colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)

6.5 ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์ตามข้อ 1.3.2

6.6 ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยการนำส่วนใสที่ได้จากข้อ 6.5 ในแต่ละช่วงเวลาไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยใช้น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส เป็นน้ำตาลมาตรฐาน โดยสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ คือ ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร คอลัมน์ชนิด Hypersil NH₂ ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) และน้ำ ในอัตราส่วน 85 : 15 อัตราการไหลของตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดคือ Refractive index detector; RI detector ที่อุณหภูมิห้อง และทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากสารอาหาร (Yp/s) จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากสารอาหาร (Yp/s)} = \frac{\text{ผลผลิต (P)} - \text{ผลผลิตเริ่มต้น (P}_0\text{)}}{\text{สารอาหารเริ่มต้น (S}_0\text{)} - \text{สารอาหาร (S)}}$$

เลือกเวลาของการเจริญที่ทำให้แบคทีเรียจากทะเลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ที่มีค่าสูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

7. การศึกษาคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

7.1 ผลของความเข้มข้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และกลีเซอรอลที่มีผลต่อคุณสมบัติของแผ่นฟิล์ม

เตรียมสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากข้อ 6 ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เติมกลีเซอรอล 10, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เทสารละลายผสม 10 มิลลิลิตร ลงในแผ่นซิลิโคนขนาด 5×5 ตารางเซนติเมตร (Figure 10) วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพแผ่นฟิล์มก่อนจะนำไปวิเคราะห์ จากนั้นลอกแผ่นฟิล์มออกจากแผ่นซิลิโคน วัดความหนาของแผ่นฟิล์มด้วยไมโครมิเตอร์ที่อ่านละเอียด 0.01 มิลลิเมตร ทำการวัดหลายๆตำแหน่งตามแนวความยาวของแผ่นฟิล์ม จากนั้นตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาดความกว้าง 1 เซนติเมตร ความยาว 5 เซนติเมตร เพื่อนำไปทดสอบความหนา ค่าการต้านทานแรงดึง และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดของแผ่นฟิล์ม



Figure 10. The silicone plate.

7.2 การวัดค่าการต้านทานแรงดึง (Tensile strength)

การวัดค่าการต้านทานแรงดึง และค่าการยืดตัวเมื่อขาด จะวัดโดยวิธีการของ ASTM (1996) โดยใช้เครื่องทดสอบความแข็งแรงของวัสดุ (universal testing machine LLYOD รุ่น 30 KN) กำหนดระยะห่างของการจับเริ่มต้น (initial grip separation) เท่ากับ 40 มิลลิเมตร และ

ความเร็วของการทดสอบ (test speed) เท่ากับ 50 มิลลิเมตรต่อนาที บันทึกแรงดึงสูงสุดและส่วนยืดสูงสุดเมื่อฟิล์มขาด

ทั้งนี้การต้านทานแรงดึง เป็นการวัดความสามารถของวัสดุที่ต้านทานต่อการขาดภายใต้แรงดึง ซึ่งจะคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{การต้านทานแรงดึง (N/mm}^2\text{)} = \frac{\text{แรงดึงสูงสุด}}{\text{พื้นที่หน้าตัดของชิ้นงาน}}$$

7.3 การวัดค่าการยืดตัวเมื่อขาด (Elongation at brake)

การยืดออกของชิ้นทดสอบที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวเริ่มต้น ซึ่งการยืดตัวนี้เกิดขึ้นภายใต้แรงดึงก่อนชิ้นงานจะขาด ซึ่งจะคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาด} = \frac{\text{ความยาวที่เพิ่มขึ้น}}{\text{ความยาวเดิม}} \times 100$$

8. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มาทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการใช้ถุงไดอะไลซิส ที่มี molecular weight cut off 8,000 ดาลตัน ใน deionized water ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำ DI ทุก 3 ชั่วโมง และทิ้งไว้ 3 วัน จากนั้นทำให้สารเข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxyl Methyl Cellulose: CMC) โรยบนถุงไดอะไลซิส ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ไปทำแห้งแบบ freeze dry ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

8.1 การทำบริสุทธิ์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเดชัน (gel filtration chromatography) ชนิด Sephadex G-100

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาผ่านคอลัมน์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเดชันชนิด Sephadex G-100 เพื่อแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ทำโดยใช้คอลัมน์ขนาด 1.0×45 เซนติเมตร ยึดคอลัมน์ขาตั้งให้ตั้งฉากกับพื้น บรรจุ Sephadex G-100 ที่อิมมัวในเอทานอลลงในคอลัมน์ที่ปิดปลายด้านล่างไว้ โดยให้ Sephadex G-100 มีความสูง 2 ใน 3 ของความ

สูงของคอลัมน์ ทำการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.3 ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร Sephadex G-100 ในคอลัมน์ จนกระทั่ง Sephadex G-100 อัดตัวกันแน่นในคอลัมน์และผิวหน้าเรียบ ปล่อยให้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ชะออกจากคอลัมน์จนกระทั่งระดับบัฟเฟอร์ Tris-HCl อยู่สูงกว่าระดับของผิวหน้าของ Sephadex G-100 เล็กน้อย ทำการปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ จากนั้นทำการเติมสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าของ Sephadex G-100 ที่อยู่ในคอลัมน์อย่างช้าๆ โดยการแตะปลายของหลอดหยด (pasteur pipette) ไปรอบๆ ผนังด้านในของคอลัมน์จนสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์หมด เปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้สารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เคลื่อนที่ลงไป ในคอลัมน์จนกระทั่งเห็นผิวหน้าของ Sephadex G-100 ทำการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยใช้อัตราการไหลของตัวชะเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอด (fraction tube) ที่ได้มาวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ข) และนำหลอดที่วิเคราะห์ว่ามีน้ำตาลทั้งหมดอยู่มารวมกัน จากนั้นทำการเอาเกลือออกโดยการทำไดอะไลซิสเหมือนกับวิธีที่กล่าวมาข้างต้น (Chin and Ming, 2004; Yunmian *et al.*, 2007) จากนั้นนำสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ไปทำแห้งแบบ freeze dry ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาตรวจสอบองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้โดยวิธีการดังต่อไปนี้

8.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC)

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์จากข้อ 8.1 ปริมาณ 500 ไมโครกรัม มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้เครื่อง Gel Permeation Chromatography, Waters 600 E โดยใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel linear (MW resolving range = 1,000 – 20,000,000) และ guard column ในการแยกขนาดของโมเลกุลโดยใช้พลูลูแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5,900 – 788,000 เป็นตัวมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับตัวอย่างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์ โดยใช้ Refractive Index Detector ในการตรวจจับสัญญาณของตัวอย่าง (Pawadee *et al.*, 2005)

8.3 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์จากข้อ 8.1 ปริมาณ 1 กรัม มาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ โดยใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (Model EQUINOX 55, Bruker) โดยใช้เทคนิค KBr pellet ซึ่งนำ

ตัวอย่างมาบดผสมกับ KBr ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย FT-IR ซึ่งช่วงคลื่นที่ใช้ทดสอบอยู่ระหว่าง $4,000-400\text{ cm}^{-1}$ (Jayaraman and Seetharaman, 2002)

8.4 การศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometry

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์จากข้อ 8.1 ปริมาณ 15 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์เพื่อหาลำดับประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry 500 MHz (Model UNITY INOVA, Varian) โดยใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิงเพื่อบอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ซึ่งมี D_2O เป็นตัวทำละลายของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Chi *et al.*, 2007)

8.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์จากข้อ 8.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยวิธี TLC ตามข้อ 3.3

8.6 การศึกษาองค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์จากข้อ 8.1 ปริมาณ 25 มิลลิกรัม มาย่อยด้วย TFA (trifluoroacetic acid) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยที่สมบูรณ์ ระเหย TFA ออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ที่ อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส โดยการเติมน้ำกลั่นลงไปในตัวอย่างและระเหยน้ำออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศจนตัวอย่างแห้งแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใหม่ ทำซ้ำวิธีการเดิมซ้ำตัวอย่างมีค่าพีเอช มากกว่า 4 ละลายตัวอย่างในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร (Methacanon *et al.*, 2005) ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยวิธี HPLC ใช้น้ำตาลมาตรฐาน 7 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโทส ไซโลส กาแลกโทส แมนโนส แรมโนส และอะราบีโนส

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ คือ ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยปริมาตร 10 ไมโครลิตร คอลัมน์ชนิด Aminex HPX-87H ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid, H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล อัตราการไหลของตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ 0.5 มิลลิลิตร ต่อนาที ตัวตรวจวัดคือ Refractive index detector; RI detector ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในทะเลที่สามารถผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์ได้

จากการเก็บตัวอย่างที่มีฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) เกาะอยู่จากชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยรวมทั้งหมด 5 แห่ง ได้แก่ แหล่งที่ 1 ทะเลน้ำพุร้อน อำเภอลองท่อม จังหวัดกระบี่ แหล่งที่ 2 สุสานหอย จังหวัดกระบี่ แหล่งที่ 3 อุทยานอ่าวพังงา จังหวัดพังงา แหล่งที่ 4 หาดปากเมง จังหวัดตรัง และแหล่งที่ 5 สะพานสารสิน จังหวัดภูเก็ต โดยที่บริเวณที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นหาดทรายและโขดหินในแนวน้ำขึ้นน้ำลง ซึ่งสิ่งมีชีวิตในบริเวณนี้ต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา เช่น ปริมาณน้ำ ระดับความเค็ม การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (Muralidharan *et al.*, 2002) และบริเวณทะเลน้ำพุร้อน เป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 45 ถึง 60 องศาเซลเซียส ทำให้จุลินทรีย์มีการสร้างสารขึ้นมาเพื่อรักษาความชื้นและป้องกันการระเหยของน้ำและมีการสร้างสารหุ้มตัวเพื่อช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดี (Pawlik, 1993) ซึ่งคาดว่าจะส่งผลให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะที่น่าสนใจได้หลากหลายชนิด

จากตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บมาจากชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมด 5 แห่ง 60 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 23 ของตัวอย่าง คือ เศษพลาสติก รองลงมาคือ เศษพืช (ร้อยละ 17), สาหร่าย (ร้อยละ 15), ก้อนหิน (ร้อยละ 10), เปลือกหอย (ร้อยละ 9), ปะการัง (ร้อยละ 8), ฟองน้ำ (ร้อยละ 7), เศษโลหะ (ร้อยละ 5) ทรายและน้ำทะเล (ร้อยละ 3) ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 11

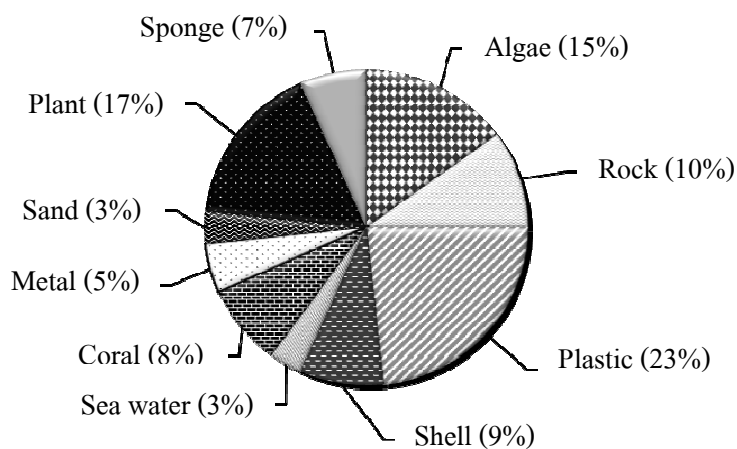


Figure 11. Percentage of specimens used for isolation of marine bacteria.

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน ได้แก่ YPM, SWM และ ZMB โดยจะคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากลักษณะโคโลนีที่มีเมือกเยิ้ม จากการทดลองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต ทำการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมแกรม (Murray *et al.*, 1994) พบว่า 61 ไอโซเลต ย้อมติดสีแกรมบวก และ 15 ไอโซเลต ย้อมติดสีแกรมลบ โดยแบคทีเรียทั้ง 76 ไอโซเลต ที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยรวมทั้ง 5 แห่ง โดยส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นแท่ง โดยสามารถแยกแบคทีเรียจากเศษพลาสติก ได้มากที่สุดคือ 19 ไอโซเลต ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้จากเศษพืช สาหร่าย ก้อนหิน เปลือกหอย น้ำทะเล ปะการัง เศษโลหะ ทราช และฟองน้ำ สามารถแยกเชื้อได้ 8, 6, 9, 10, 1, 2, 8, 11 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยสามารถแยกแบคทีเรียจากบริเวณอุทยานอ่าวพังงา หาดปากเมง ทะเลน้ำพุร้อน สะพานสารสิน และสุสานหอย ได้ 24, 17, 15, 13 และ 7 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 11 ซึ่งบริเวณอุทยานอ่าวพังงา หาดปากเมง สะพานสารสิน และสุสานหอยเป็นบริเวณหาดทรายและโขดหินในแนวน้ำขึ้นน้ำลง ซึ่งสิ่งมีชีวิตในบริเวณนี้จึงต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา จึงทำให้แบคทีเรียสร้างสารที่มีลักษณะเป็นเมือกขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเอง (Muralidharan *et al.*, 2002) ส่วนบริเวณทะเลน้ำพุร้อนเป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 45 ถึง 60 องศาเซลเซียส ทำให้จุลินทรีย์มีการสร้างสารที่มีลักษณะเป็นเมือกขึ้นมาเพื่อรักษาความชื้นและป้องกันการระเหยของน้ำออกจากเซลล์ (Pawlik, 1993)

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตรที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน ได้แก่ YPM, SWM และ ZMB พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากทะเลได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต โดยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SWM สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดคือ 37 ไอโซเลต (ร้อยละ 49) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SWM ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อของ Jayaraman และ Seetharaman (2002) ซึ่งมีเปปโตน (10.0 กรัมต่อลิตร) และเนื้อสกัด (10.0 กรัมต่อลิตร) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SWM นั้นจะมีเฉพาะแหล่งไนโตรเจนอยู่ในปริมาณที่มากซึ่งอาจส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่นๆ (Kudryashova and Yurlova, 2000) อาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากเป็นอันดับที่ 2 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPM สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 35) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPM ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อของ Shivakumar และ Vijayendra (2006) ซึ่งมีซูโครส (20.0 กรัมต่อลิตร) ยีสต์สกัด (3.0 กรัมต่อลิตร) และเปปโตน (5.0 กรัมต่อลิตร) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPM มีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตสาร (Lee *et al.*,

1997) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ZMB แยกเชื้อได้น้อยที่สุดคือ 12 ไอโซเลต (ร้อยละ 16) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ZMB ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อของ Kae และคณะ (2002) ซึ่งมีเปปโตน (1.0 กรัมต่อลิตร) และยีสต์สกัด (1.0 กรัมต่อลิตร) เป็นองค์ประกอบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ZMB จะมีแหล่งไนโตรเจนอยู่ในปริมาณที่น้อยจึงทำให้เชื้อเจริญได้น้อย (McKellar *et al.*, 2003) ดังแสดงใน Figure 12

Table 11. Location, number of bacteria from specimens, gram staining characteristic and shape of exopolysaccharides producing marine bacteria.

Location	Number of bacteria from specimens										Total	Gram stain		Shape
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		+	-	
1	10	-	1	2	1	1	-	-	-	-	15	13	2	rod
2	-	-	3	-	1	-	2	1	-	-	7	6	1	rod
3	9	8	-	4	3	-	-	-	-	-	24	22	2	rod
4	-	-	2	3	5	-	-	7	-	-	17	11	6	rod
5	-	-	-	-	-	-	-	-	11	2	13	9	4	rod
Total	19	8	6	9	10	1	2	8	11	2	76	61	15	

Remark: Locations; Hot spring, Krabi province (1), Fossil Records, Krabi province (2), Phangnga Bay, Phangnga province (3), Pak Meng Beach, Trang province (4) and Sarasin Bridge, Phuket province (5).

Specimens; plastic (A), plant (B), algae (C), rock (D), shell (E), sea water (F), coral (G), metal (H), sand (I) and sponge (J).

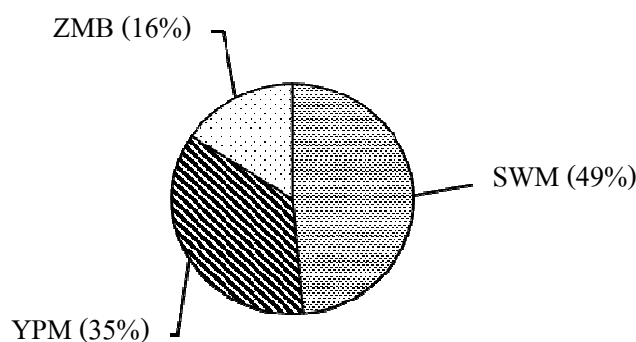


Figure 12. Number of exopolysaccharides producing marine bacteria isolated by using SWM, YPM and ZMB media.

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยรวมทั้งหมด 5 แห่ง ได้ 76 ไอโซเลต พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการคัดแยกเชื้อได้ 5 มิลลิลิตร ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จะอยู่ในช่วง 0.043–2.83 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Table 12 จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากกว่า 2 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสามารถคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 20 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดคือไอโซเลต CNEP003 ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง ซึ่งแยกได้จากฟิล์มชีวภาพบนพลาสติกที่เก็บได้จากทะเลน้ำพุร้อน อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ โดยผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 2.83 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนไอโซเลตที่ให้ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์รองลงมาได้แก่ CNEP015, CNEP021, CNEP070, CNEP079, CNEP071, CNEP018, CNEP020, CNEP026, CNEP024, CNEP008, CNEP017, CNEP040, CNEP013, CNEP051, CNEP043, CNEP012, CNEP029, CNEP019 และ CNEP034 โดยผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 2.76, 2.74, 2.71, 2.68, 2.58, 2.58, 2.52, 2.49, 2.42, 2.34, 2.31, 2.28, 2.26, 2.20, 2.19, 2.13, 2.08, 2.04 และ 2.02 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

Table 12. Exopolysaccharides production from marine bacteria isolated from the specimens collected in coastal areas in Thailand. Marine bacteria were cultivated in SWM, YPM and ZMB media.

Isolates	Dry cell weight (DCW) (g/l)	EPS (g/l)	Yield (g EPS / g DCW)
CNEP003	0.012 ± 0.0004	0.034 ± 0.0007	2.83 ± 0.023
CNEP015	0.013 ± 0.0003	0.037 ± 0.0015	2.76 ± 0.096
CNEP021	0.004 ± 0.0003	0.010 ± 0.0001	2.74 ± 0.035
CNEP070	0.014 ± 0.0004	0.039 ± 0.0002	2.71 ± 0.070
CNEP079	0.013 ± 0.0001	0.035 ± 0.0002	2.68 ± 0.025
CNEP071	0.012 ± 0.0001	0.032 ± 0.0004	2.58 ± 0.028
CNEP018	0.002 ± 0.0001	0.006 ± 0.0002	2.58 ± 0.091
CNEP020	0.002 ± 0.0001	0.005 ± 0.0002	0.52 ± 0.057
CNEP026	0.002 ± 0.0002	0.005 ± 0.0004	2.49 ± 0.052
CNEP024	0.002 ± 0.0002	0.005 ± 0.0002	2.42 ± 0.023
CNEP008	0.002 ± 0.0003	0.005 ± 0.0003	2.34 ± 0.023

Table 12. (Continued)

Isolates	DCW (g/l)	EPS (g/l)	Yield (g EPS / g DCW)
CNEP017	0.004 ± 0.0001	0.009 ± 0.0002	2.31 ± 0.057
CNEP040	0.002 ± 0.0002	0.005 ± 0.0002	2.28 ± 0.089
CNEP013	0.002 ± 0.0004	0.005 ± 0.0002	2.26 ± 0.046
CNEP051	0.003 ± 0.0002	0.008 ± 0.0018	2.20 ± 0.056
CNEP043	0.006 ± 0.0002	0.013 ± 0.0009	2.19 ± 0.046
CNEP012	0.009 ± 0.0026	0.019 ± 0.0015	2.13 ± 0.039
CNEP029	0.010 ± 0.0035	0.020 ± 0.0003	2.08 ± 0.086
CNEP019	0.006 ± 0.0014	0.013 ± 0.0002	2.04 ± 0.048
CNEP034	0.011 ± 0.0028	0.020 ± 0.0014	2.02 ± 0.047
CNEP072	0.006 ± 0.0006	0.010 ± 0.0006	1.72 ± 0.058
CNEP031	0.010 ± 0.0013	0.017 ± 0.0032	1.69 ± 0.065
CNEP052	0.009 ± 0.0012	0.015 ± 0.0011	1.60 ± 0.057
CNEP033	0.010 ± 0.0007	0.016 ± 0.0008	1.54 ± 0.057
CNEP068	0.008 ± 0.0004	0.012 ± 0.0006	1.47 ± 0.071
CNEP069	0.009 ± 0.0007	0.013 ± 0.0004	1.46 ± 0.026
CNEP032	0.010 ± 0.0007	0.013 ± 0.0011	1.37 ± 0.045
CNEP055	0.017 ± 0.0012	0.023 ± 0.0011	1.37 ± 0.035
CNEP022	0.004 ± 0.0005	0.005 ± 0.0001	1.34 ± 0.036
CNEP048	0.007 ± 0.0003	0.009 ± 0.0001	1.34 ± 0.069
CNEP062	0.008 ± 0.0005	0.010 ± 0.0002	1.28 ± 0.068
CNEP060	0.002 ± 0.0002	0.003 ± 0.0041	1.26 ± 0.058
CNEP023	0.008 ± 0.0005	0.011 ± 0.0004	1.25 ± 0.057
CNEP058	0.013 ± 0.001	0.015 ± 0.0003	1.22 ± 0.046
CNEP046	0.007 ± 0.0003	0.008 ± 0.0003	1.15 ± 0.059
CNEP027	0.024 ± 0.004	0.026 ± 0.0031	1.11 ± 0.026
CNEP066	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.0002	1.09 ± 0.046
CNEP054	0.013 ± 0.0014	0.014 ± 0.0007	1.06 ± 0.090
CNEP057	0.014 ± 0.0002	0.014 ± 0.0012	1.05 ± 0.091

Table 12. (Continued)

Isolates	DCW (g/l)	EPS (g/l)	Yield (g EPS / g DCW)
CNEP050	0.009 ± 0.0002	0.009 ± 0.0003	1.04 ± 0.051
CNEP037	0.007 ± 0.0004	0.007 ± 0.0001	1.01 ± 0.056
CNEP005	0.003 ± 0.0002	0.003 ± 0.001	0.83 ± 0.056
CNEP011	0.009 ± 0.001	0.007 ± 0.0005	0.83 ± 0.035
CNEP074	0.007 ± 0.0003	0.004 ± 0.0006	0.65 ± 0.063
CNEP080	0.008 ± 0.0015	0.004 ± 0.0002	0.59 ± 0.065
CNEP073	0.009 ± 0.0029	0.005 ± 0.0012	0.56 ± 0.045
CNEP063	0.012 ± 0.0003	0.006 ± 0.0004	0.54 ± 0.027
CNEP056	0.015 ± 0.0006	0.008 ± 0.0007	0.53 ± 0.071
CNEP064	0.011 ± 0.0025	0.005 ± 0.0004	0.51 ± 0.045
CNEP075	0.010 ± 0.0011	0.005 ± 0.0008	0.50 ± 0.035
CNEP025	0.012 ± 0.0002	0.006 ± 0.0003	0.48 ± 0.018
CNEP038	0.005 ± 0.0023	0.002 ± 0.0004	0.46 ± 0.026
CNEP065	0.011 ± 0.0004	0.005 ± 0.0007	0.46 ± 0.053
CNEP007	0.004 ± 0.0002	0.002 ± 0.0003	0.46 ± 0.086
CNEP061	0.013 ± 0.0028	0.005 ± 0.0015	0.45 ± 0.056
CNEP016	0.013 ± 0.0003	0.005 ± 0.0001	0.41 ± 0.016
CNEP039	0.006 ± 0.0023	0.002 ± 0.0009	0.40 ± 0.017
CNEP014	0.014 ± 0.0009	0.005 ± 0.0007	0.35 ± 0.025
CNEP067	0.004 ± 0.0002	0.001 ± 0.0009	0.34 ± 0.036
CNEP053	0.014 ± 0.0006	0.004 ± 0.0003	0.27 ± 0.028
CNEP076	0.009 ± 0.0007	0.002 ± 0.0012	0.25 ± 0.069
CNEP078	0.009 ± 0.0005	0.002 ± 0.001	0.23 ± 0.056
CNEP077	0.012 ± 0.0012	0.003 ± 0.0006	0.23 ± 0.046
CNEP049	0.030 ± 0.0002	0.006 ± 0.0001	0.21 ± 0.012
CNEP001	0.013 ± 0.0002	0.003 ± 0.0009	0.20 ± 0.074
CNEP035	0.014 ± 0.0006	0.003 ± 0.0002	0.19 ± 0.003
CNEP059	0.015 ± 0.0015	0.003 ± 0.0003	0.19 ± 0.034

Table 12. (Continued)

Isolates	DCW(g/l)	EPS (g/l)	Yield (g EPS / g DCW)
CNEP002	0.013 ± 0.0005	0.002 ± 0.0002	0.19 ± 0.023
CNEP009	0.012 ± 0.0004	0.001 ± 0.0004	0.18 ± 0.015
CNEP045	0.007 ± 0.0011	0.001 ± 0.0004	0.16 ± 0.077
CNEP047	0.004 ± 0.0003	0.001 ± 0.0004	0.15 ± 0.077
CNEP042	0.009 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001	0.15 ± 0.007
CNEP041	0.010 ± 0.0017	0.001 ± 0.0002	0.09 ± 0.033
CNEP030	0.009 ± 0.0007	0.001 ± 0.0002	0.05 ± 0.016
CNEP028	0.008 ± 0.0002	0.0004 ± 0.0001	0.05 ± 0.015
CNEP036	0.012 ± 0.0004	0.001 ± 0.0002	0.05 ± 0.013

จากการนำเชื้อที่คัดเลือกได้ 20 ไอโซเลต มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงสุด โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ทำการคัดเลือกเชื้อได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลต เท่านั้นที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงกว่า 2 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ไอโซเลต CNEP003, CNEP079, CNEP071, CNEP070 และ CNEP012 โดยสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 3.05, 2.90, 2.79, 2.63 และ 2.45 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Figure 13 ส่วนไอโซเลตอื่นๆ ที่มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ออกมาน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

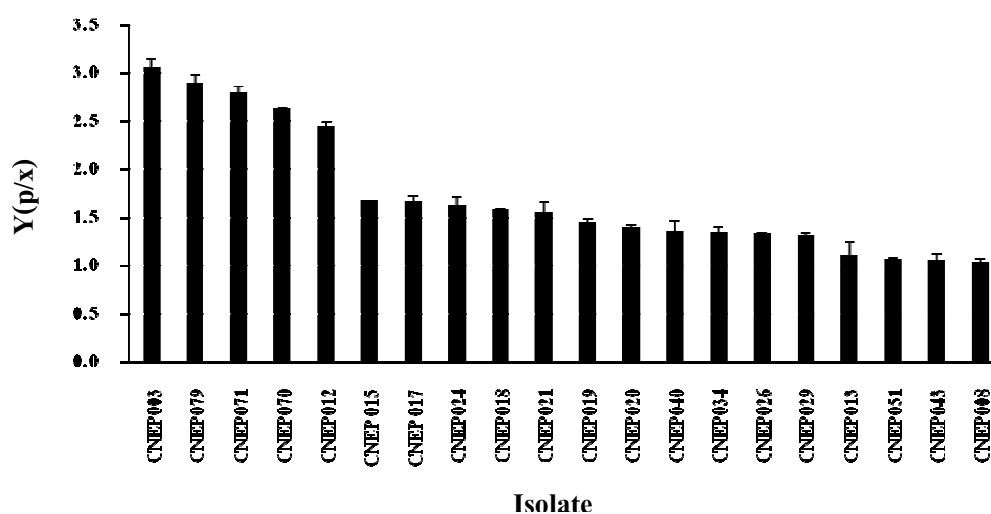


Figure 13. Yield of exopolysaccharides produced by 20 selected isolates were cultivated in SWM, YPM and ZMB media.

2. การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 จำนวน 20 ไอโซเลต มาทำการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย Promega kit และวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการใช้ 1% agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA/EcoRI+HindIII Marker ผลจากการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างจะมีนิวคลีโอไทด์ประมาณ 21,226 – 30,000 bp จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มปริมาณขึ้น 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Forward Primer เป็น 27F และ Reverse Primer เป็น 1492R พบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR จะมีนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,375 bp การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจะทำโดยการส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลีด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ automated DNA sequencer

จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ได้จากแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล 20 ไอโซเลตกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลของ Genbank ดังแสดงใน Table 13 จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อแสดงผลการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล (Figure 14) พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อได้เป็น 7 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต CNEP008 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต CNEP015, CNEP003, CNEP070, CNEP071, CNEP013 และ CNEP012 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Bacillus* กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต CNEP049, CNEP019, CNEP034, CNEP029, CNEP079, CNEP024, CNEP021 และ CNEP026 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Pseudoalteromonas* กลุ่มที่ 4 ได้แก่ CNEP051 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Vibrio* กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลต CNEP017 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* กลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลต CNEP043 และ CNEP020 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Alteromonas* และกลุ่มที่ 7 ได้แก่ ไอโซเลต CNEP018 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Marinobacter* และจากผลการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล พบว่า เชื้อ CNEP026 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudoalteromonas* sp. 82 เปอร์เซนต์ ซึ่งน่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ส่วนเชื้อ CNEP008 และ CNEP051 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อก่อโรค โดยเชื้อ *S. epidermidis* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนัง ส่วนเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในมนุษย์

Table 13. Identification results of exopolysaccharides producing strains by 16S rDNA analysis.

Strain	Closely related species	Accession number	Similarity (%)
CNEP008	<i>Staphylococcus epidermidis</i> BBAR7-13d ^T	FJ217188	99 (1414/1419)
CNEP003	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 ^T	AB325583	99 (1416/1421)
CNEP012	<i>Bacillus subtilis</i> CECT39 ^T	AJ276351	99 (1434/1441)
CNEP013	<i>Bacillus subtilis</i> CECT39 ^T	AJ276351	99 (1436/1444)
CNEP015	<i>Bacillus pumilus</i> NBRC12092 ^T	AB271753	99 (1411/1414)
CNEP070	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 ^T	AB325583	99 (1414/1419)
CNEP071	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 ^T	AB325583	99 (1424/1432)
CNEP019	<i>Pseudoalteromonas whanghaensis</i>	DQ011615	98 (1401/1420)
CNEP021	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i> FR1302 ^T	DQ011614	99 (1401/1412)
CNEP024	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i> FR1302 ^T	DQ011614	99 (1402/1413)
CNEP026*	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i> FR1302 ^T	DQ011614	82* (1180/1424)
CNEP029*	<i>Pseudoalteromonas whanghaensis</i>	DQ011615	96* (1375/1424)
CNEP034	<i>Pseudoalteromonas whanghaensis</i>	DQ011615	98 (1396/1420)
CNEP040	<i>Pseudoalteromonas whanghaensis</i>	DQ011615	98 (1408/1427)
CNEP079	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i> FR1302 ^T	DQ011614	98 (1391/1418)
CNEP051	<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC17749 ^T	X74690	99 (1419/1429)
CNEP017	<i>Pseudomonas douderoffii</i> MBIC1298 ^T	AB019390	98 (1395/1421)
CNEP020	<i>Alteromonas macleodii</i> IAM 12920 ^T	X74690	99 (1396/1408)
CNEP043	<i>Alteromonas macleodii</i> IAM 12920 ^T	X82145	99 (1394/1404)
CNEP018	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> S6-02 ^T	EU624424	98 (1405/1420)

Remark: * New strain

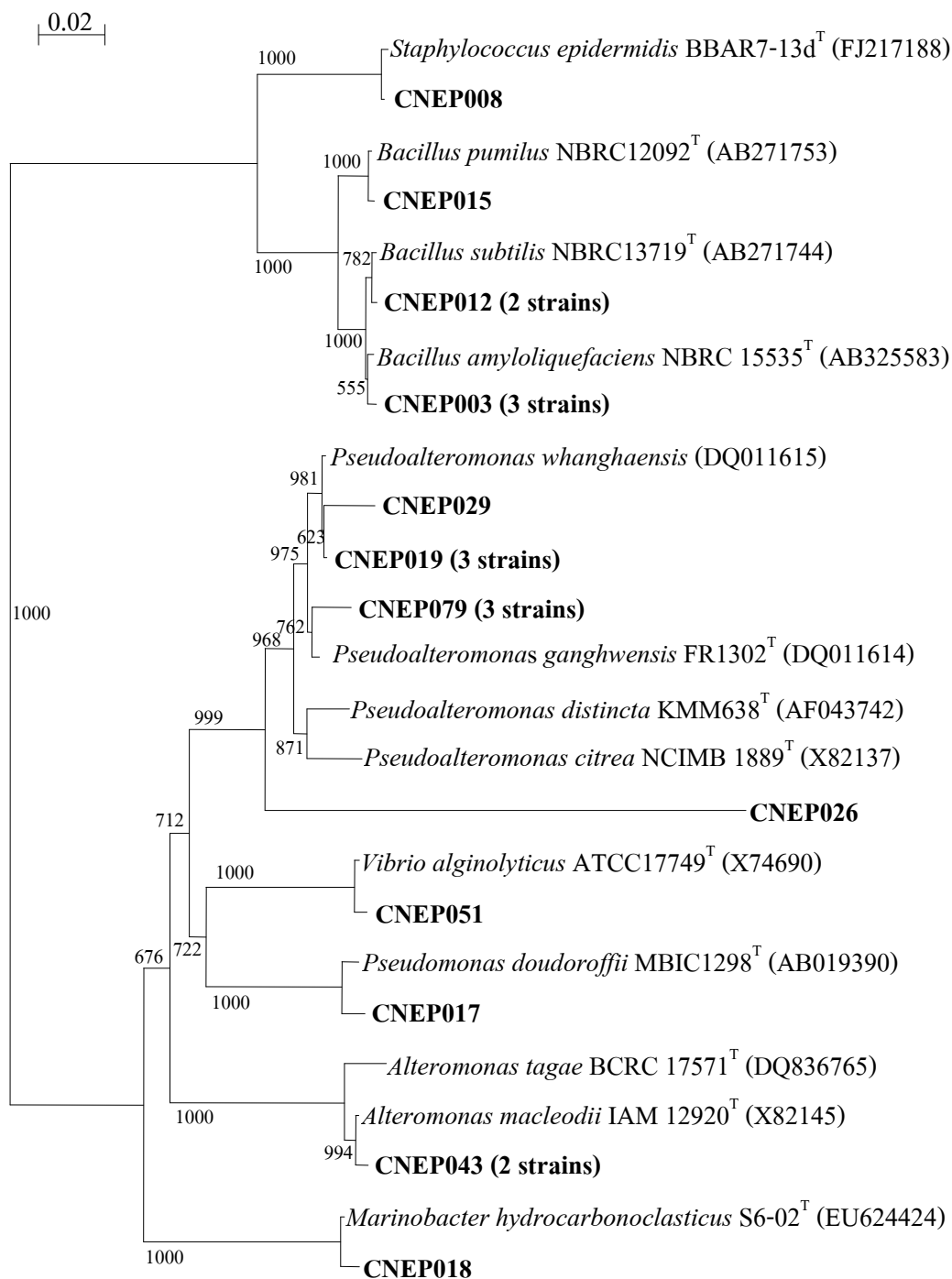


Figure 14. Phylogenetic tree analysis based on almost completed 16S rDNA gene sequence.

Numbers within the phylogenetic tree indicate the percentages of occurrence of the branching order in 1000 bootstrapped trees. *T* is type strain.

จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ได้จากแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล 5 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ดังแสดงใน Table 13 และ Figure 14 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต CNEP003, CNEP070 และ CNEP071 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T (99 เปอร์เซ็นต์) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีรูปร่างแบบแท่ง ข้อมติคิสิแกรมบวก และมีการสร้างสปอร์ตำแหน่งตรงปลายของเซลล์ (Figure 15) ไอโซเลต CNEP012 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* NBRC13719^T (99 เปอร์เซ็นต์) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อมีรูปร่างแบบแท่ง ข้อมติคิสิแกรมบวก และมีการสร้างสปอร์ตำแหน่งตรงปลายของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kim และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *B. subtilis* (99.77 เปอร์เซ็นต์) เมื่อทำการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ CNEP079 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudoalteromonas ganghwensis* FR1302^T (98 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ CNEP079 มีรูปร่างแบบแท่งและข้อมติคิสิแกรมลบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ (Rougeaux *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงเลือกเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

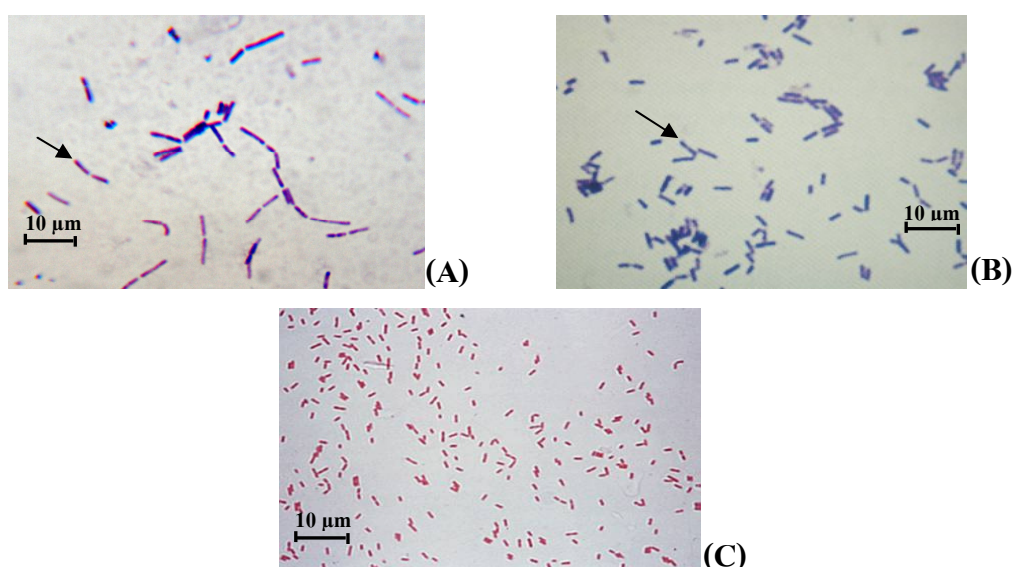


Figure 15. Morphology under microscopic view ($\times 100$) of (A) *B. amyloliquefaciens* CNEP003, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 and *B. amyloliquefaciens* CNEP071, (B) *B. subtilis* CNEP012, and (C) *P. ganghwensis* CNEP079. Arrows indicate spores. Bar, 10 µm.

3. การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยการเปรียบเทียบปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้น

จากการนำเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเหลวได้สูงจากข้อ 1 และผลจากการจัดจำแนกเชื้อที่ยืนยันว่าไม่เป็นเชื้อก่อโรคจากข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหาร SWM, YPM และ ZMB พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต (Figure 16) สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPM โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003, *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP071, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 และ *B. subtilis* CNEP012 ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 3.07, 2.87, 2.75, 2.62 และ 2.40 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SWM เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003, *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP071, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 และ *B. subtilis* CNEP012 ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 2.76, 2.62, 2.37, 2.43 และ 2.20 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีแหล่งไนโตรเจนอยู่ในปริมาณมากทำให้เชื้อนำไปใช้ในการเจริญมากกว่านำมาผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ZMB เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003, *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP071, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 และ *B. subtilis* CNEP012 ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 1.81, 1.80, 1.56, 1.53 และ 1.76 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดังกล่าวมีปริมาณสารอาหารอยู่อย่างจำกัดและไม่มีแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Prasertsan *et al.*, 2008) ดังนั้นจากการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรีย อาจเนื่องจากคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Gokcen *et al.*, 2007)

จากผลการทดลองที่แสดงใน Figure 16 พบว่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPM โดยที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด โดยคิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์ได้เท่ากับ 3.07 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อ *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP071, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 และ *B. subtilis* CNEP012 ให้ผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 2.87, 2.75, 2.62 และ 2.40 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 14 ซึ่งสูงกว่าผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการทดลองของ Maria และคณะ (1996) ซึ่งศึกษาการ

ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus thermoantarcticus* พบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อ *Pseudoalteromonas ruthenica* ที่แยกได้จากน้ำทะเลสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 1.6 กรัมต่อลิตร (Saravanan และ Jayachandran, 2007) แต่น้อยกว่าจากการทดลองของ Chi และ Fang (2005) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Cyanothece* sp. 113 ในอาหารสูตร F/2 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 12 วัน สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ถึง 18.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาถึงผลผลิตต่อเซลล์ ($Y_{p/x}$) พบว่า ไอโซเลต *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีผลผลิตต่อเซลล์สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลต *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

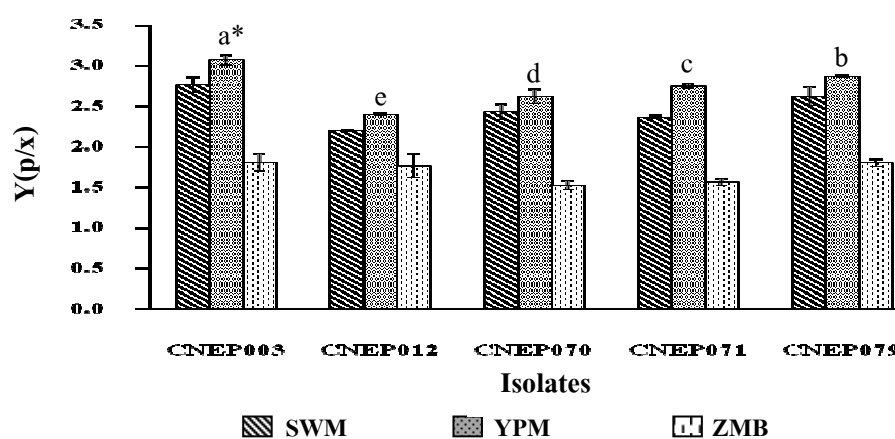


Figure 16. Yield of EPS produced by selected isolates when cultivated in SWM, YPM and ZMB media.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

Table 14. Comparison of the amount of exopolysaccharides and yield of exopolysaccharides obtained from selected marine bacteria.

Isolate	Dry Cell weight (DCW) (g/l)	EPS (g/l)	Yield (g EPS/ g DCW)
CNEP003	1.03 ± 0.002	3.16 ± 0.015	3.07 ^{a*}
CNEP012	0.98 ± 0.002	2.35 ± 0.018	2.40 ^e
CNEP070	1.01 ± 0.003	2.65 ± 0.017	2.62 ^d
CNEP071	1.02 ± 0.002	2.81 ± 0.017	2.75 ^c
CNEP079	1.03 ± 0.002	2.96 ± 0.019	2.87 ^b

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

จากการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย Dichloromethane: Acetonitrile: Acetic acid: Water ในอัตราส่วน 5: 3: 3: 1.5 โดยปริมาตร โดยมีน้ำตาลแรมโนส ไชโลส อะราบีโนส ฟรุกโทส แมนโนส กลูโคส และกาแลคโตสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน พบว่า TLC chromatogram ที่ตรวจสอบด้วย anisaldehyde ของน้ำตาลมาตรฐานทั้ง 7 ชนิดคือ แรมโนส ไชโลส อะราบีโนส ฟรุกโทส แมนโนส กลูโคส กาแลคโตส และมอลโทส มีค่า Retention factor (R_f) เท่ากับ 0.46, 0.35, 0.31, 0.28, 0.27, 0.25 0.23 และ 0.15 ตามลำดับ ส่วนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต CNEP003, CNEP070, CNEP071, CNEP012 และ CNEP079 ทุกตัวอย่างให้ค่า R_f เท่ากับ 0.25 ซึ่งตรงกับค่า R_f ของน้ำตาลมาตรฐานกลูโคสเพียงชนิดเดียว ดังแสดงใน Figure 17 จากการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นพบว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันจะสร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดเดียวกันในขณะที่เชื้อต่างสายพันธุ์กันก็อาจสามารถสร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลชนิดเดียวกันได้อีกด้วยแต่อาจมีอยู่ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (Linton *et al.*, 1991) เช่นการทดลองของ Kae และคณะ (2002) ศึกษาคุณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ 7 สายพันธุ์ คือ *Micrococcus luteus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Agrobacterium vitis*, *A. vitis* และ *Sulfitobacter pontiacus* ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล นำไปเลี้ยงในอาหาร YMG broth บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 120 รอบต่อนาที พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 7 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไรโบส และ ไชโลส และการทดลองของ Lemoine และคณะ (1997) ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Streptococcus thermophilus* SFi39 และ SFi12 พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *S. thermophilus* SFi39 ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโทส ในขณะที่เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *S. thermophilus* SFi12 ประกอบด้วยกลูโคส กาแลคโทส และแรมโนส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีองค์ประกอบหลักของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็นกลูโคสและผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดจึงเลือก *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

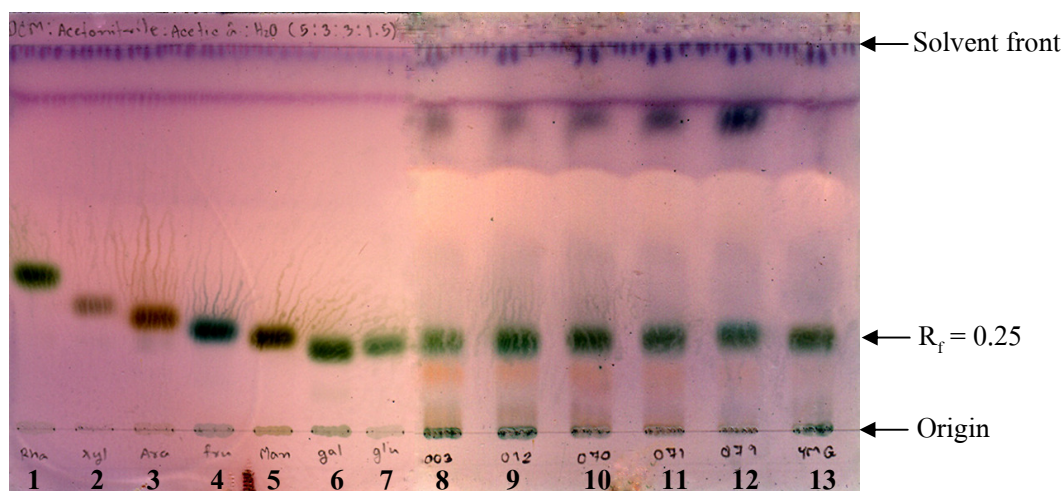


Figure 17. Thin layer chromatogram (TLC) of EPS samples (Lane 1: rhamnose, Lane 2: xylose, Lane 3: arabinose, Lane 4: fructose, Lane 5: mannose, Lane 6: galactose, Lane 7: glucose, Lane 8: hydrolysed EPS of *B. amyloliquefaciens* CNEP003, Lane 9: *B. subtilis* CNEP012, Lane 10: *B. amyloliquefaciens* CNEP070, Lane 11: *B. amyloliquefaciens* CNEP071, Lane 12: *P. ganghwensis* CNEP079 and Lane 13: control YPM medium).

จากการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการศึกษาความหนืดของสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่ามีเพียงแค่ 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถวัดค่าความหนืดได้ โดยยึดค่า % torque ในช่วง 30-90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเกณฑ์ในการเลือกค่าความหนืดที่วัดได้ เนื่องจากในช่วงดังกล่าวค่าความหนืดที่ได้ถือเป็นค่าที่เชื่อถือได้ (Lewis, 1996) โดยพบว่าความหนืดของสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เมื่อวัดที่ความเร็ว 1 รอบต่ออนาทีให้ความหนืดมากที่สุด โดยสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีความหนืดเป็น 653 cP (Table 15) ซึ่งเป็นค่าความหนืดที่สูงที่สุด ส่วนสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *P. ganghwensis* CNEP079, *B. amyloliquefaciens* CNEP071, *B. amyloliquefaciens* CNEP070 และ *B. subtilis* CNEP012 พบว่ามีความหนืดเท่ากับ 46, 35, 29 และ 15 cP ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Dupont และคณะ (2000) ที่ศึกษาความหนืดของสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M, *Lactobacillus*

rhamnosus R และ *Lactobacillus paracasei* Type V พบว่าความหนืดของสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากเชื้อ *L. rhamnosus* ATCC 9595M, *L. rhamnosus* R และ *L. paracasei* Type V มีค่าความหนืดเท่ากับ 450 mPa, 550 mPa และ 300 mPa ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความหนืดที่เท่ากันหรือต่างกันได้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและมวลโมเลกุลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตขึ้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีค่าความหนืดและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุดและมีองค์ประกอบหลักเป็นกลูโคส จึงเลือกเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

Table 15. Viscosity of exopolysaccharides obtained from marine bacteria cultivated in YPM broth and incubated at 45 °C for 96 h.

Strain	Viscosity (cP)
<i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP003	653
<i>P. ganghwensis</i> CNEP079	46
<i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP071	35
<i>B. amyloliquefaciens</i> CNEP070	29
<i>B. subtilis</i> CNEP012	15

4. การหา Time course ของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้

นำเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเหลวได้สูงที่สุดจากข้อ 3.1 มาศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YPM บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยการศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24 โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.18 เป็น 1.17 กรัมต่อลิตร จากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลงและเข้าสู่ระยะคงที่ เชื้อมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.17 กรัมต่อลิตร และในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 จะเริ่มมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดคือ 3.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 3.04 กรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง (Figure 18) และหลังจากชั่วโมงที่

96 พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลงอย่างต่อเนื่อง การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 จะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะคงที่ แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เป็นแบบที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non growth-associated production) สอดคล้องกับการทดลองของ Shih และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. subtilis* (Natto) Takahashi พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. subtilis* B-1 พบว่าที่เวลา 10 ชั่วโมงแรกเชื้อมีการเจริญสูงที่สุดแต่มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์น้อย และเชื้อมีการเจริญที่ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 20 แต่มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น (Morikawa *et al.*, 2006) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุด จึงเลือกการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 96 ชั่วโมง สำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

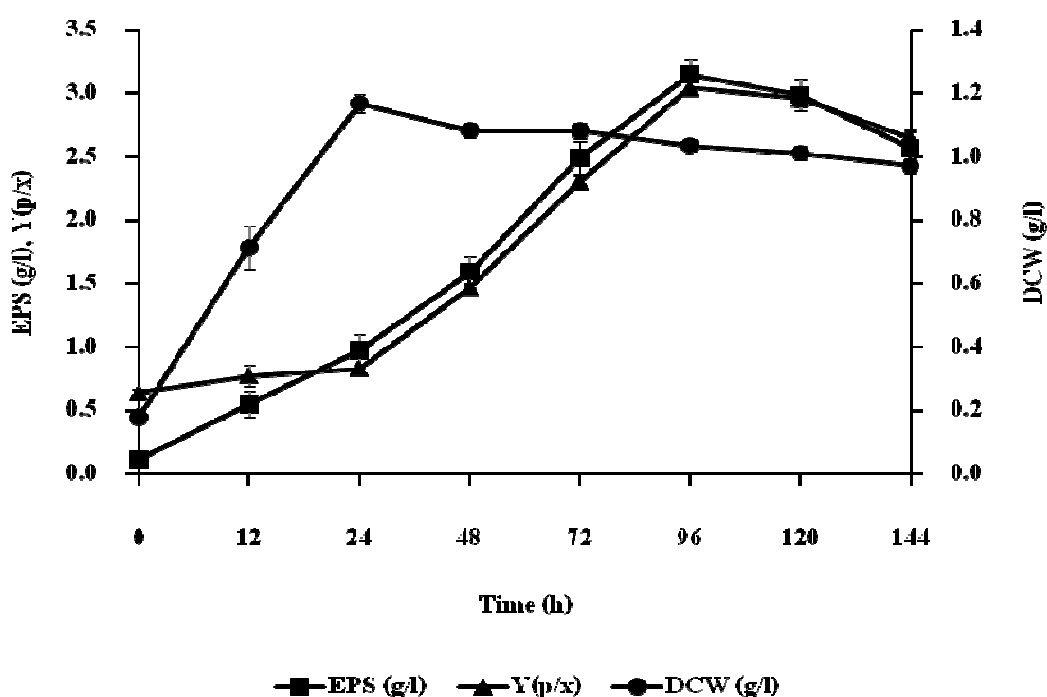


Figure 18. Time course of cell growth and exopolysaccharides production obtained from *B. amyloliquefaciens* CNEP003 cultivated in YPM broth and incubated at 45 °C.

5. สภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้

5.1 ชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YPM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ซูโครส แลคโทส และโมลาส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปในการมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เจริญได้น้อยในอาหารที่มีกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เจริญได้ดีในอาหารที่มีแลคโทสและโมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน (Figure 19) และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิด ที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงที่สุด โดยมีปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 3.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโทส และโมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 2.55, 1.42 และ 2.08 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Himanshu และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Bacillus megaterium* ในอาหารที่มีกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส แลคโทส และมอลโทส พบว่า *B. megaterium* ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดในการที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 9.20 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการทดลองของ Lee และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Bacillus polymyxa* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส กาแลคโทส แลคโทส และสารละลายแป้งพบว่า *B. polymyxa* สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และนอกจากนี้ยังพบว่า *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AP-1 และ AP-3 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *P. pentosaceus* สายพันธุ์ AP-1 และ AP-3 ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 6 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Smitinont et al., 1999)

การที่น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 อาจเนื่องมาจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ผลิตเอนไซม์ซูเครส (sucrase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการกระตุ้นให้มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากซูโครส โดยเอนไซม์ซูเครสจะทำหน้าที่สังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มโฮโมโพลีแซคคาไรด์ซึ่งอาจจะเป็นกลูแคน (glucans) โดยมีหน่วยย่อยของน้ำตาล คือน้ำตาลกลูโคส หรือฟรุกแทน

(fructans) ซึ่งมีหน่วยย่อย คือฟรุกโทส (Van Hijum *et al.*, 2006) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 96 ชั่วโมง จะทำให้ได้อัตราการผลิตสูงสุด จึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

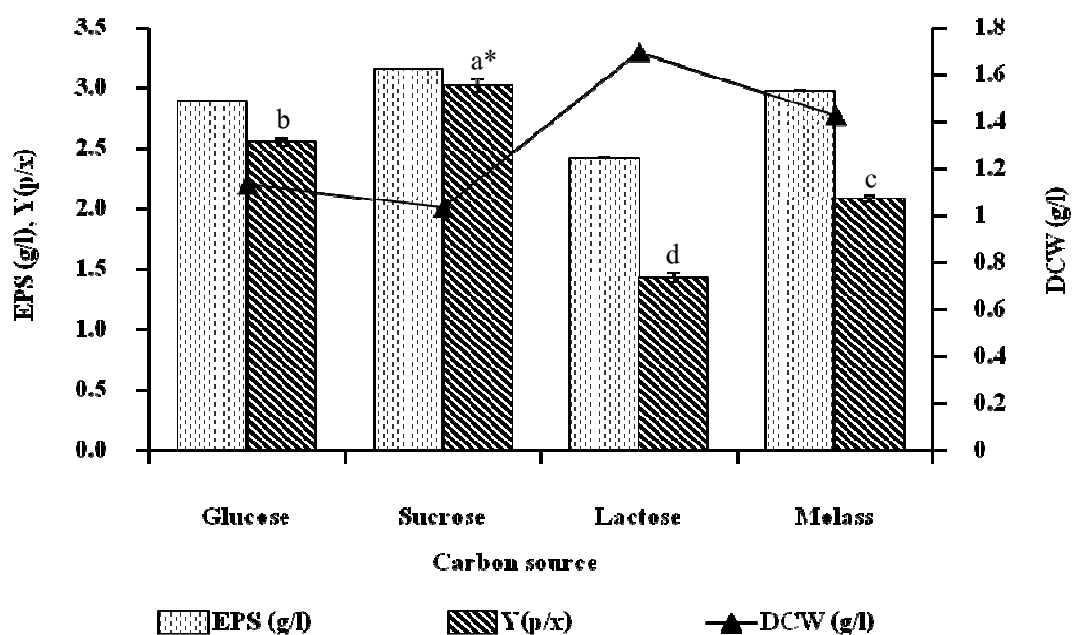


Figure 19. Effect of carbon sources on cell growth, exopolysaccharides production by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

5.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YPM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีความสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของซูโครส โดยที่เมื่อความเข้มข้นของซูโครสสูงขึ้น การเจริญของเชื้อและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย โดยการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ 6.46 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์

เท่ากับ 4.73 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Figure 20) แต่เมื่อความเข้มข้นของซูโครสมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลง อาจเนื่องมาจากเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไปอาจจะเป็นอันตรายต่อระบบเมแทบอลิซึมของเชื้อ (Fang and Zhong, 2002) และความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย (Bryan *et al.*, 1986) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Gokcen และคณะ (2007) ที่ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* G1 และ *Pseudomonas putida* G12 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 30 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะลดลง Lee และคณะ (1997) ศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* พบว่าเมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มมากขึ้นการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Arskold และคณะ (2007) ที่ศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้น้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 100 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงถึง 3.4 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้อัตราการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุด จึงเลือกความเข้มข้นของซูโครส 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

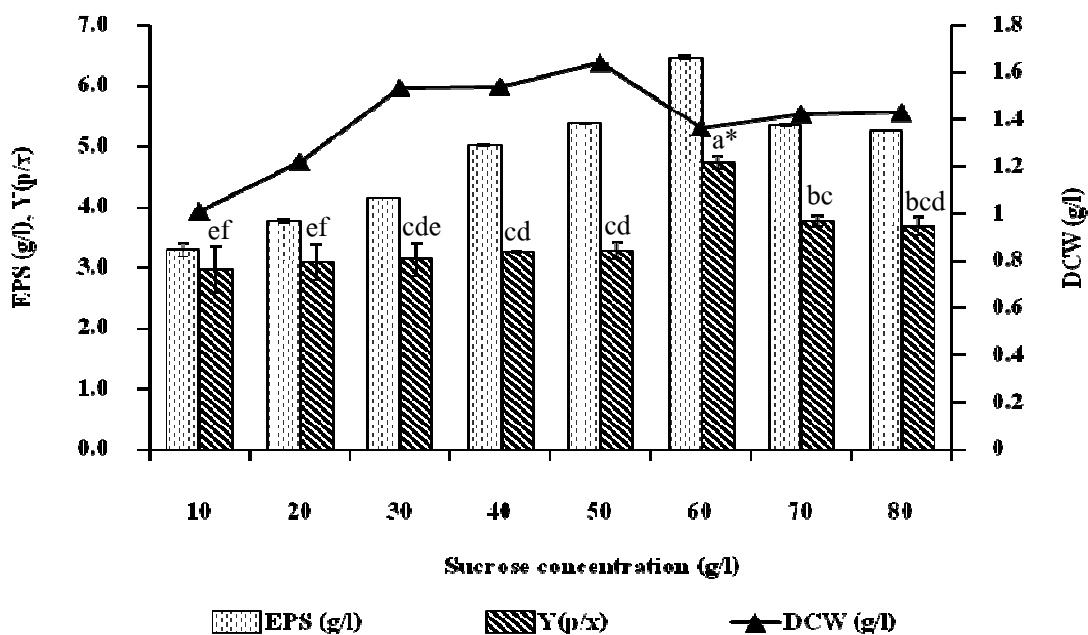


Figure 20. Effect of sucrose concentrations on cell growth, exopolysaccharides production by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

5.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YMG ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ ซูโครส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด เปปโตน เนื้อสกัด และแอมโมเนียมไนเตรด ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในการมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เจริญได้น้อยในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เจริญได้ดีในอาหารที่มียีสต์สกัด เนื้อสกัด และยีสต์สกัดร่วมกับเปปโตนเป็นไนโตรเจน (Figure 21) และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด ที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้สูงที่สุด โดยมีปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 7.23 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 5.47 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่การใช้เปปโตน เนื้อสกัด แอมโมเนียมไนเตรด และยีสต์สกัดร่วมกับเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อผลิตเอ็กโซ

โพลีแซคคาไรด์ได้ 4.81, 3.95, 1.76 และ 4.90 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ McKellar และคณะ (2003) ที่ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Agrobacterium radiobacter* พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่นเดียวกับการทดลองของ Andrea และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Agaricus brasiliensis* พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

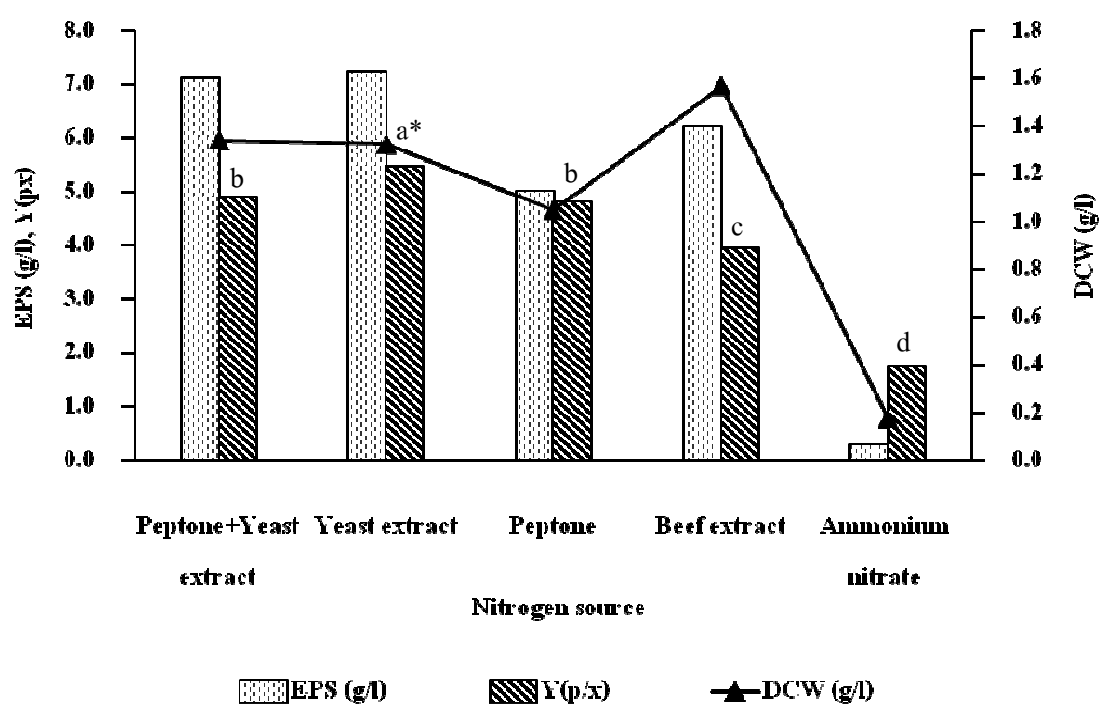


Figure 21. Effect of nitrogen sources on cell growth, exopolysaccharides production by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

5.4 ความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YMG ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ ซูโครส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 2, 4, 6, 8.47, 10 และ 12 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคา

ไรต์โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีความสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัด เมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดสูงขึ้น การเจริญของเชื้อและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย โดยการใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 8.47 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุด คือ 7.56 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 5.67 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Figure 22) แต่เมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดมากกว่า 8.47 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตของ Degeest และคณะ (1999) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Streptococcus thermophilus* LY03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้เปปโตน ร่วมกับยีสต์สกัด ในอัตราส่วน 2.5:1 (w/w) โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 1.4, 2.1, 2.8, 4.2, 5.6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 4.2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 1,142 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 5.6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้ลดลงเหลือ 833 และ 901 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพราะถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งไนโตรเจนที่มากเกินไปจะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจนจะช่วยเพิ่มการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Sutherland, 1990) อย่างไรก็ตามในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงจะทำให้มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เพิ่มขึ้น (Degeest and De Vuyst, 2000) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ชูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้อัตราการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุด จึงเลือกความเข้มข้นของยีสต์สกัด 8.47 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

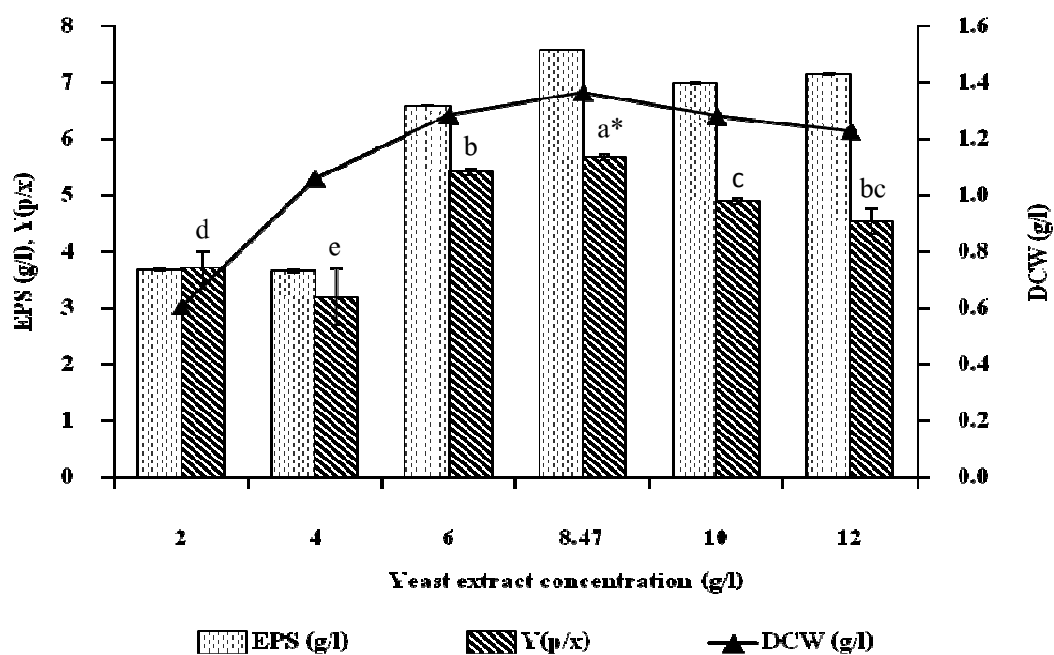


Figure 22. Effect of yeast extract concentrations on cell growth, exopolysaccharides production by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

5.5 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YMG ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ ซูโครส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ยีสต์สกัด ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5, 6 และ 6.5 (ชุดควบคุม) แต่เจริญได้น้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7, 7.5 และ 8 (Figure 23) โดยเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเท่ากับ 7.5 โดยปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 10.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 9.58 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Figure 23) สอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* ที่พีเอช 5, 6, 7, 8, 9 และ 10

พบว่าที่พีเอช 5 และ 6 ผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้น้อย และเมื่อพีเอชเท่ากับ 7 เชื่อสามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด แต่เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นเชื่อผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้น้อยลง เช่นเดียวกับการทดลองของ Shu และ Lung (2003) พบว่าเมื่อพีเอชในอาหารมีค่าสูงขึ้น ปริมาณของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ก็จะมากขึ้นด้วย แต่เมื่อพีเอชในอาหารลดลง (กรด) ปริมาณของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ก็จะลดลงด้วย Silvia และ Crispin (2006) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *Pseudomonas* และ *Arthrobacter* ที่พีเอช 5, 6, 7 และ 8 พบว่า ที่พีเอช 5 และ 6 เชื่อผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้น้อย และเมื่อพีเอชเท่ากับ 7 เชื่อสามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด แต่เมื่อพีเอชเท่ากับ 8 เชื่อผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้น้อยลง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ชูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้อัตราการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์สูงที่สุด จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

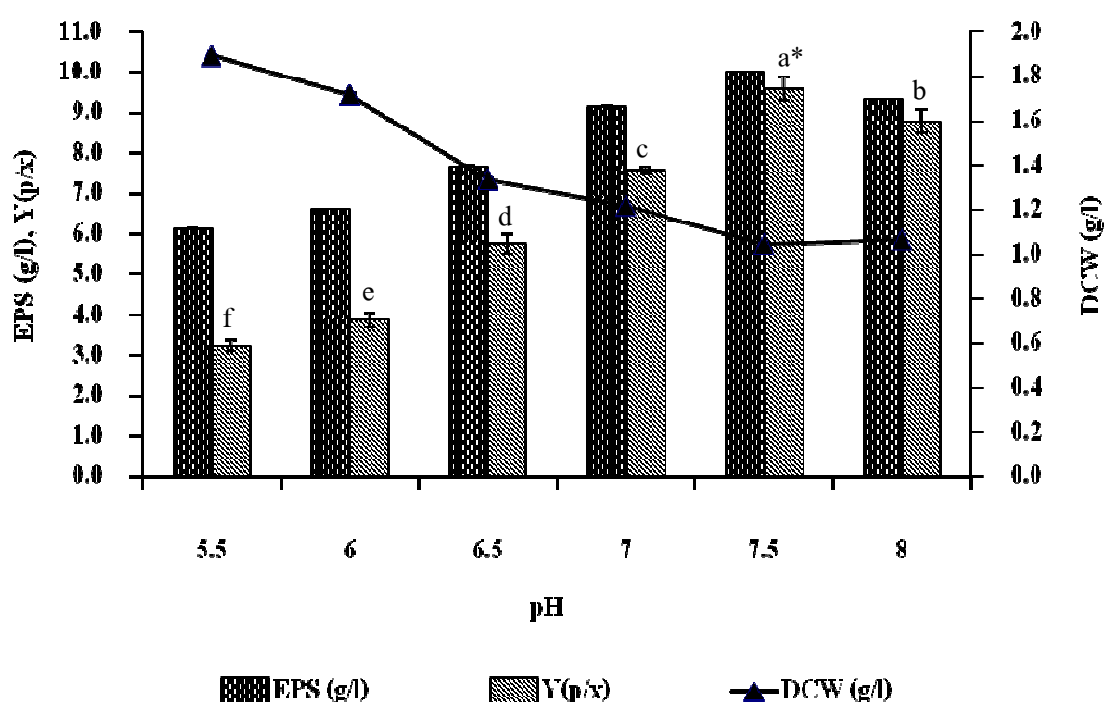


Figure 23. Effect of initial pH on cell growth, exopolysaccharides production by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 after cultivation at 45 °C for 96 h.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

5.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหาร YMG ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ ซูโครส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ยีสต์สกัด ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30 (อุณหภูมิห้อง), 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 11.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 10.36 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Figure 24) อาจเนื่องมาจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 แยกได้จากพลาสติกที่เก็บได้จากทะเลน้ำพุร้อนอำเภอกลองท่อม จังหวัดกระบี่ ซึ่งอุณหภูมิที่วัดได้ในบริเวณที่เก็บตัวอย่างประมาณ 45 ถึง 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 25, อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) และ 55 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้น้อยและปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ลดลงเหลือ 7.75, 8.32 และ 10.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 8.37, 9.39 และ 10.21 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Figure 24) สอดคล้องกับการทดลองของ Vuyst และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Streptococcus thermophilus* โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 352 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลงเหลือ 202 และ 325 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อไม่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Seo และคณะ (2004) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. CS101 ในถังหมักที่มี ซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.25 เปอร์เซ็นต์ และกรดคาซามิโน (casamino acid) 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ และใช้อุณหภูมิในการหมักคือ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด คือ 17.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ในถังหมัก Arskold และคณะ (2007) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lacobacillus reuteri* ATCC 55730 โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 43 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 0.73 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 43 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ลดลงเหลือ 0.36 และ 0.38 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง

คาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ที่เวลา 96 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้อัตราการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุด จึงเลือกบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

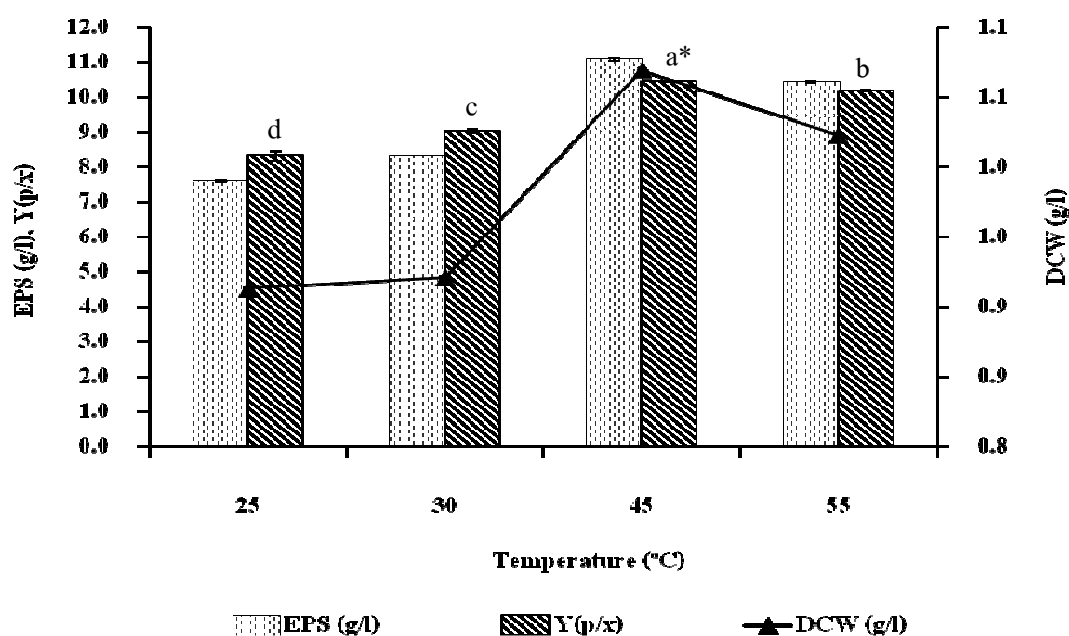


Figure 24. Effect of temperature on cell growth, exopolysaccharides production by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 for 96 h.

* Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

6. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเลที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่เหมาะสม

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยซูโครส 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัด 8.47 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยติดตามการเจริญของเชื้อและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 240 ชั่วโมง โดยทำการวัดการเจริญของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 4 วิธี คือ วัดการเจริญของเชื้อ โดยการวัดความ

ขุ่นของเซลล์ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร วัดการเจริญของเชื้อโดยการหาโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ วัดการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดการเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการวัดการเจริญของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ทั้ง 4 วิธีพบว่าให้ผลการทดลองที่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (satationary phase) ในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงใน Figure 25

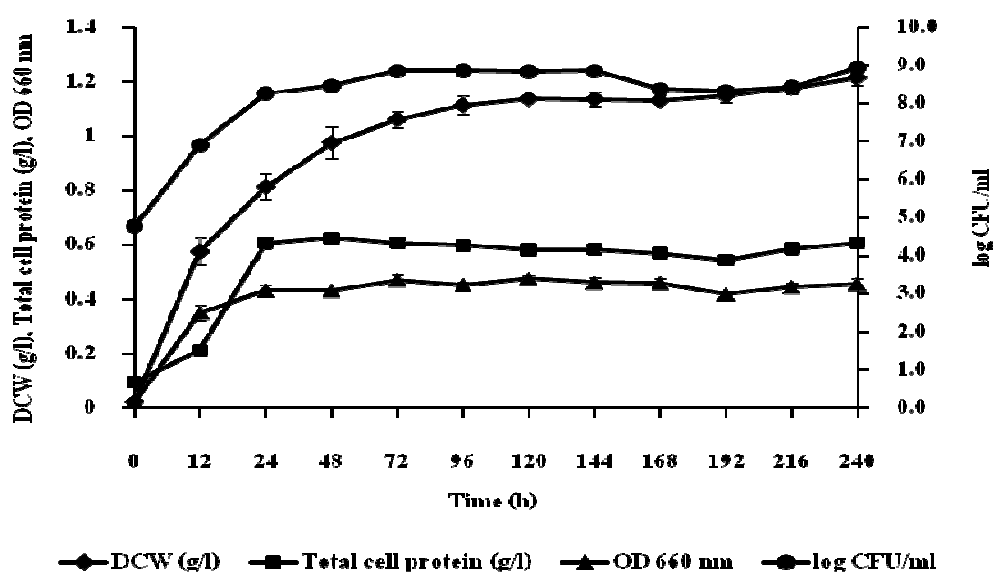


Figure 25. Growth curve of *B. amyloliquefaciens* CNEP003 in YMG broth (pH 7.5, 45 °C) containing 60 g/l sucrose and 8.47 g/l yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively.

การผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 จะเริ่มมีการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์อย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดคือ 12.48 กรัมต่อลิตร (Figure 26a) คิดเป็นผลผลิตต่อเซลล์เท่ากับ 20.51 กรัมต่อกรัมโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ และสัมประสิทธิ์การสร้างผลผลิตจากมวลเซลล์ (Yp/x) เท่ากับ 11.44 กรัมเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Figure 26b และหลังจากชั่วโมงที่ 96 พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ลดลงอย่างช้าๆ การผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 จะผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะคงที่ แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 เป็นแบบที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non

growth-associated production) สอดคล้องกับการทดลองของ Shih และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. subtilis* (Natto) Takahashi พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. subtilis* B-1 พบว่าที่เวลา 10 ชั่วโมงแรกเชื้อมีการเจริญสูงที่สุดแต่มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์น้อย และเชื้อมีการเจริญที่ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 20 แต่มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น (Morikawa *et al.*, 2006) ในทางตรงกันข้ามการทดลองของ Patil และคณะ (2009) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. subtilis* พบว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ ซึ่งเป็นแบบที่สัมพันธ์กับการเจริญ (growth-associated production)

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 7.1 เหลือ 5.59 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ (Figure 26a) และลดลงอย่างช้าๆ เมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 240 ชั่วโมง พบว่ามีค่าพีเอชเท่ากับ 5.27 แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jayaraman และ Seetharaman (2002) ที่ศึกษาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Vibrio alginolyticus* พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 7 เหลือ 4.7 ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และพีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 96 โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 เช่นเดียวกับการทดลองของ Martensson และคณะ (2003) ที่ศึกษาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus brevis* G-77 และ *Pediococcus damnosus* 2.6 พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างต่อเนื่องโดยเชื้อ *L. brevis* G-77 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจาก 6 เหลือ 4 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 24 ส่วนเชื้อ *P. damnosus* 2.6 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจาก 6 เหลือ 4.2 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 24

เมื่อศึกษาการใช้น้ำตาลของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก จะทำให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงอย่างรวดเร็วตามไปด้วย โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลงจาก 5.2 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 1.19 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เริ่มลดลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 240 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลงเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ (Figure 26a) และสัมพันธ์กับการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Yp/s) จะเริ่มมีการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อสามารถ

เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 0.25 กรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อกรัมซูโครส (Figure 26b) และหลังจากชั่วโมงที่ 96 พบว่าเชื้อมีการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ลดลงอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีความสัมพันธ์กับการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำตาลซูโครสถูกใช้ไปสำหรับการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Prasertsan และคณะ (2007) ที่ศึกษาการใช้น้ำตาลซูโครสของเชื้อ *Enterobacter cloacae* WD7 พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลซูโครสก็จะลดลงด้วย โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เชื้อ *E. cloacae* WD7 ใช้ไปจะลดลงจาก 3 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 72 ชั่วโมง และการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Yp/s) เท่ากับ 0.2 กรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อกรัมซูโครส เช่นเดียวกับการทดลองของ Lee และคณะ (1997) ที่ศึกษาการใช้น้ำตาลซูโครสของเชื้อ *Bacillus polymyxa* พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลซูโครสก็จะลดลงด้วย โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เชื้อ *B. polymyxa* ใช้ไปจะลดลงจาก 80 กรัมต่อลิตร เป็น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 50 ชั่วโมง และการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Yp/s) เท่ากับ 0.3 กรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อกรัมซูโครส

เมื่อเปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ใช้ยีสต์สกัดและเปปโตนที่ความเข้มข้น 3 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ก่อนที่จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร (Figure 18) แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 หลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงถึง 12.48 กรัมต่อลิตร (Figure 26a) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะทำให้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากขึ้นถึงประมาณ 4 เท่าตัว ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มมากขึ้น (ประมาณ 3 เท่า) ส่งผลให้มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นด้วย แสดงว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Bacillus polymyxa* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส กาแลกโทส แล็กโทส และสารละลายแป้ง พบว่า *B. polymyxa* สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่ 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Arskold และคณะ (2007) ที่ศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ความเข้มข้นของซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการทดลองของ Prasertsan และคณะ (2008) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Enterobacter cloacae* WD7 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *E. cloacae* WD7 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะก่อนที่จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 2.23 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *E. cloacae* WD7 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะหลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 2.71 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ในอาหารที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะทำให้ได้อัตราการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 12.48 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้สำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

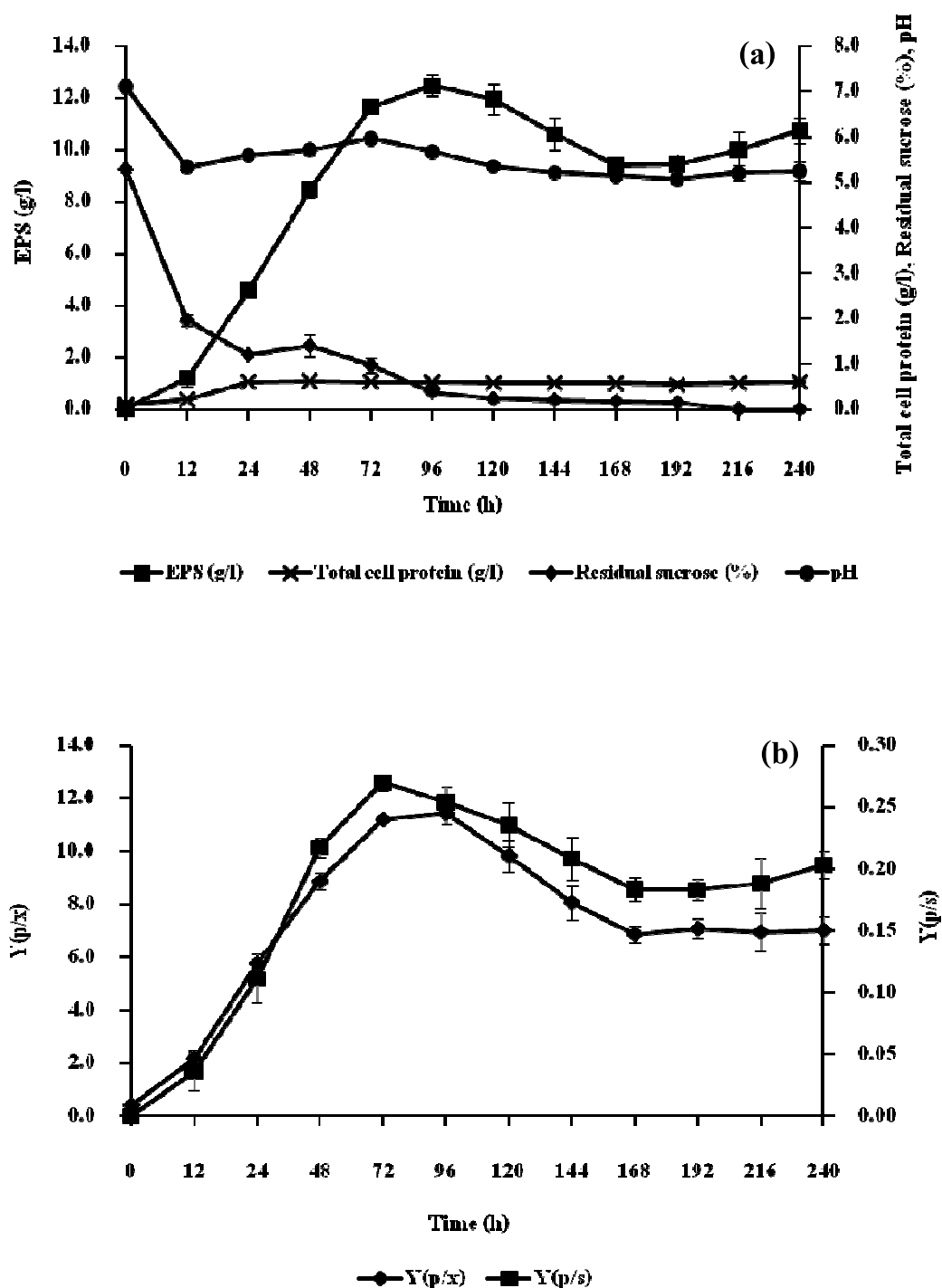


Figure 26. Time course of cell growth, exopolysaccharides production, pH and residual sugar (a); product yield coefficient ($Y_{p/x}$) and ($Y_{p/s}$) (b); of *B. amyloliquefaciens* CNEP003 in YMG broth (pH 7.5, 45 °C) containing 60 g/l sucrose and 8.47 g/l yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively.

7. คุณสมบัติของฟิล์มจากเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจากทะเล

ฟิล์มเกิดขึ้นได้จากการทำให้สารที่สามารถเกิดฟิล์มได้ละลายหรือกระจายตัวแล้วใช้วิธีต่างๆในการแยกสารนั้นออกจากตัวทำละลาย เช่นการทำให้ตัวทำละลายระเหยไป การปรับความเป็นกรด-ด่าง หรือทำให้สารที่เกิดฟิล์มซึ่งหลอมเหลวแข็งตัว ฟิล์มมีองค์ประกอบหลักคือพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งมีคุณสมบัติเกิดฟิล์มได้ ตัวทำละลายและสารเจือปนซึ่งเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์ม (Romero-Bastida *et al.*, 2004)

จากการทดลองนำเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์จาก *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มาขึ้นรูปฟิล์ม โดยเตรียมจากสารละลายเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์ ซึ่งพลาสติกไซเซอร์จะไปลดแรงดึงดูระหว่างโมเลกุลของฟิล์มและเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ทำให้ฟิล์มมีสภาพยืดหยุ่นขึ้น แข็งแรงขึ้นลดความเปราะ และทำให้ฟิล์มไม่เกิดการแตกยุ่ยเป็นชิ้นเล็กๆระหว่างการเก็บ (Krochta, 2000) โดยเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์ลงในสารละลายพอลิเมอร์ระหว่างการละลายที่มีการกวนผสมจากนั้นจึงนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยการเทสารละลายพอลิเมอร์ลงในแผ่นซิลิโคนทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพราะถ้าใช้อุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้อัตราการระเหยของตัวทำละลายเร็วเกินไปโมเลกุลของพอลิเมอร์จะถูกตรึงก่อนที่จะมีการรวมตัวกันอย่างเหมาะสมและต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์ซึ่งจะมีผลทำให้ฟิล์มที่ได้มีรอยตำหนิ เช่น การเกิดรูเข็ม (pinholes) หรือทำให้ฟิล์มมีความหนาไม่สม่ำเสมอ ซึ่งจะมีผลทำให้ฟิล์มมีการซึมผ่านมากขึ้น (Banker, 1996) จากผลการทดลองพบว่าฟิล์มที่เตรียมจากเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเหนียว บาง และฉีกขาดง่ายไม่สามารถลอกออกจากแผ่นซิลิโคนได้ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นแผ่นฟิล์ม ส่วนแผ่นฟิล์มที่ได้จากเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ฟิล์มที่มีลักษณะสีขาวขุ่น มีความอ่อนนุ่ม ยืดหยุ่นดี ดังแสดงใน Figure 27 และเมื่อความเข้มข้นของเอ็กซ์โพสิทีฟแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ได้จะมีความหนามากขึ้นคือ 0.053, 0.085 และ 0.114 มิลลิเมตร ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อปริมาณพอลิเมอร์เพิ่มมากขึ้นแต่ถูกจำกัดให้อยู่ในพื้นที่จำกัดจะทำให้เกิดการซ้อนทับกันของโมเลกุลจึงทำให้ความหนามากขึ้น

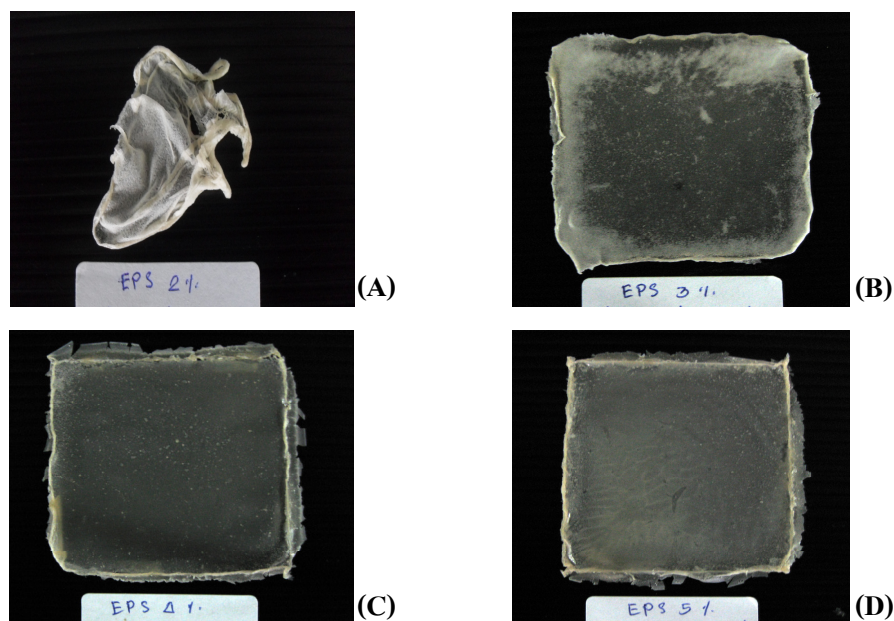


Figure 27. Appearances of film prepared from exopolysaccharide produced by *B. amyloliquefaciens* CNEP 003 at concentrations of 2% (A), 3% (B), 4% (C) and 5% (D) with 20% glycerol.

เมื่อทำการทดลองศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิตฟิล์ม พบว่าฟิล์มที่ผลิตได้มีความหนาอยู่ระหว่าง 0.051 ถึง 0.134 มิลลิเมตร (Table 16) โดยฟิล์มที่ผลิตได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาน้อยที่สุด เท่ากับ 0.051 มิลลิเมตร และมีลักษณะเปราะ บาง ส่วนฟิล์มที่ผลิตได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ มีความหนามากที่สุด เท่ากับ 0.134 มิลลิเมตร และมีลักษณะขึ้นเหนียว อ่อนนุ่มมาก ดังนั้นความเข้มข้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้น ส่วนผลของพลาสติกไซเซอร์คือ ปริมาณกลีเซอรอลต่อความหนาของฟิล์ม พบว่ากลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ผลิตได้จะมีความหนามากที่สุด และมีลักษณะขึ้นเหนียว อ่อนนุ่มมาก กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 25 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาและความเหนียวรองลงมาตามลำดับ ส่วนกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มมีความหนาน้อยที่สุด และมีลักษณะเปราะ บาง แสดงว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้นความหนาจะเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Silva และคณะ (2009) ที่ศึกษาความหนาของฟิล์มที่ผลิตจากแพคติน (pectin) และแอลจินเนต (alginate) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์ ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้คือ 1, 3, 5, 7, 10, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าฟิล์มมีความหนาเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากการละลายไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดลักษณะเป็นผลึกบน

แผ่นฟิล์มความหนาจึงเพิ่มขึ้น ส่วนการเติมพลาสติกไซเซออร์ทำให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะไม่เปราะและมีความยืดหยุ่นสูงขึ้น ปริมาณการใช้พลาสติกไซเซออร์โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 10-60 โดยน้ำหนักแห้ง (Guibert, 1986) หากปริมาณพลาสติกไซเซออร์มากเกินไปจะส่งผลต่อคุณสมบัติของฟิล์ม โดยจะทำให้สมบัติการซึมผ่านไอน้ำและสมบัติเชิงกลด้อยลง เช่นปริมาณกลีเซอรอลที่มากเกินไปไม่ทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นขึ้น หรือช่วยในการเตรียมฟิล์มดีขึ้น โดยกลีเซอรอลจะเพิ่มความยืดหยุ่นของแผ่นฟิล์มเมื่อผสมไปจนถึงปริมาณหนึ่ง และถ้าผสมเกินกว่านี้จะได้ฟิล์มที่มีสมบัติด้อยลง เนื่องจากปริมาณกลีเซอรอลที่สูงเกินไปจะไปขัดขวางการระเหยของน้ำจากแผ่นฟิล์ม ทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้ขึ้นเหนอะหนะ โดยความหนาของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ควรมีความหนาไม่เกิน 0.010-0.100 มิลลิเมตร (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2534) ซึ่งจากการทดลองพบว่าความหนาของแผ่นฟิล์มที่ได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลความเข้มข้น 10, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ส่วนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลความเข้มข้น 10, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (Table 16)

เมื่อนำแผ่นฟิล์มจากโพลีเมอร์มาทำการทดสอบความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มโดยการทดสอบการต้านทานแรงดึง (tensile strength) ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของวัสดุที่ต้านทานต่อการขาดภายใต้แรงดึง ผลการทดลองแสดงดัง Table 16 พบว่าเมื่อปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น ค่าการต้านทานแรงดึงจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าการต้านทานแรงดึงอยู่ระหว่าง 0.282 ถึง 9.671 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร ฟิล์มที่ผลิตได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการต้านทานแรงดึงสูงที่สุด เท่ากับ 9.671 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร และฟิล์มที่ผลิตได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการต้านทานแรงดึงน้อยที่สุด เท่ากับ 0.282 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (2004) ที่ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มที่ผลิตจากเจลเลน (gellan) โดยการวัดค่าการต้านทานแรงดึงของฟิล์มที่ความเข้มข้นของเจลเลน 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของเจลเลน 10 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าการต้านทานแรงดึงมากที่สุด และที่ความเข้มข้นของเจลเลน 2 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าการต้านทานแรงดึงน้อยที่สุด ส่วนผลของพลาสติกไซเซออร์ คือ ปริมาณกลีเซอรอลต่อความต้านทานแรงดึงของฟิล์ม พบว่าที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าการต้านทานแรงดึงแตกต่างจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าการต้านทานแรงดึงมากที่สุด ความเข้มข้น 20 และ 25 มีค่าการต้านทานแรงดึงรองลงมาตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าการต้านทานแรงดึงน้อยที่สุด แสดงว่าเมื่อ

ปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นค่าการต้านทานแรงดึงจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kester และ Fennema (1986) เมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้นค่าการต้านทานแรงดึงจะลดลง เช่นเดียวกับการทดลองของ Bergo และ Sobral (2007) ที่ศึกษาค่าการต้านทานแรงดึงของฟิล์มที่ความเข้มข้น 0, 15, 30 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ของกลีเซอรอล พบว่าที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าการต้านทานแรงดึงมากที่สุด ความเข้มข้น 15 และ 30 มีค่าการต้านทานแรงดึงรองลงมาตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าการต้านทานแรงดึงน้อยที่สุด แสดงว่าเมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้นค่าการต้านทานแรงดึงจะลดลง อาจเนื่องมาจากปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เติมลงไปจะไปจับกับพอลิเมอร์เกิดพันธะมีขั้วหรือพันธะไฮโดรเจน ทำให้แรงระหว่างโมเลกุลของสายโพลีเมอร์ที่อยู่ใกล้กันอ่อนลงฟิล์มจึงมีความยืดหยุ่นมากขึ้นและมีการต้านทานแรงดึงลดลง (Bergo and Sobral, 2007) โดยค่าการต้านทานแรงดึงขาดของแผ่นฟิล์มทุกการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นแผ่นฟิล์มได้ ยกเว้นแผ่นฟิล์มที่ได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 ที่ความเข้มข้นของ กลีเซอรอล เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกำหนดค่าการต้านทานแรงดึงขาดต่ำที่สุดเท่ากับ 1.089 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2529)

เมื่อนำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์มาทำการทดสอบความแข็งแรงของแผ่นฟิล์ม โดยทดสอบการยืดตัวเมื่อขาด (elongation at brake) ซึ่งเป็นการหาระยะทางที่ฟิล์มยืดออกด้วยแรงดึงจนขาดต่อความยาวเดิม ถ้าการยืดของฟิล์มน้อยแสดงว่าฟิล์มมีลักษณะเปราะและไม่ยืดหยุ่น (Guibert, 1986) ผลการทดลองแสดงดัง Table 16 พบว่าเมื่อปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การยืดตัวจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าการยืดตัวเมื่อขาดอยู่ระหว่าง 25.68 ถึง 168.83 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ผลิตได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดมากที่สุด เท่ากับ 168.83 เปอร์เซ็นต์ และฟิล์มที่ผลิตได้จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดน้อยที่สุด เท่ากับ 25.68 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (2004) ที่ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มที่ผลิตจากเจลาติน (gelatin) โดยการวัดค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มที่ความเข้มข้นของเจลาติน 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของเจลาติน 8 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดมากที่สุด และที่ความเข้มข้นของเจลาติน 2 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดน้อยที่สุด ส่วนผลของพลาสติกไซเซอร์ คือปริมาณกลีเซอรอลต่อค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม พบว่าที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดแตกต่างจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 25, 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าความสามารถในการยืดตัวเมื่อขาดมากที่สุด ความ

เข้มข้น 25 และ 20 มีค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดรองลงมาตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดน้อยที่สุด แสดงว่าเมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดจะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kester และ Fennema (1986) เมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดจะเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Bergo และ Sobral (2007) ที่ศึกษาความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดของฟิล์มที่ความเข้มข้น 0, 15, 30 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ของกลีเซอรอล พบว่าที่ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดมากที่สุด ความเข้มข้น 30 และ 15 มีค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดรองลงมาตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดน้อยที่สุด เมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นค่าความสามารถในการยึดตัวเมื่อขาดจะเพิ่มขึ้นด้วย อาจเนื่องมาจากปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เติมลงไปจะไปจับกับพอลิเมอร์เกิดพันธะมีขั้วหรือพันธะไฮโดรเจน ทำให้แรงระหว่างโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ที่อยู่ใกล้กันอ่อนลง พลาสติกไซเซอร์และพอลิเมอร์จับยึดเข้าด้วยกันด้วยแรงวาเลนซีทุติยภูมิ (secondary valency) ฟิล์มจึงมีความยืดหยุ่นมากขึ้นและความเปราะของฟิล์มลดลง

Table 16. Effect of exopolysaccharides and glycerol concentrations on thickness, tensile strength and elongation at brake of film from *B. amyloliquefaciens* CNEP003.

EPS concentration (%)	Glycerol concentration (%)	Thickness (mm)	Tensile strength (N/mm ²)	% Elongation at brake
3	10	0.051 ± 0.001 ^l	5.589 ± 0.085 ^c	25.68 ± 2.509 ^k
	20	0.053 ± 0.001 ^k	1.580 ± 0.018 ^f	57.70 ± 3.203 ^h
	25	0.064 ± 0.001 ^j	1.141 ± 0.024 ^h	105.01 ± 4.732 ^f
	30	0.073 ± 0.001 ^h	0.236 ± 0.003 ^k	138.67 ± 4.836 ^c
4	10	0.071 ± 0.001 ⁱ	7.097 ± 0.078 ^b	32.39 ± 3.228 ^j
	20	0.085 ± 0.001 ^g	1.781 ± 0.037 ^d	76.92 ± 4.349 ^g
	25	0.091 ± 0.001 ^f	1.707 ± 0.056 ^e	115.79 ± 5.694 ^e
	30	0.105 ± 0.001 ^d	0.313 ± 0.006 ^j	152.22 ± 4.694 ^b
5	10	0.102 ± 0.001 ^e	9.671 ± 0.101 ^a	42.39 ± 3.535 ⁱ
	20	0.114 ± 0.001 ^c	1.798 ± 0.092 ^d	102.30 ± 3.025 ^f
	25	0.124 ± 0.001 ^b	1.338 ± 0.079 ^g	128.11 ± 3.694 ^d
	30	0.134 ± 0.001 ^a	0.473 ± 0.003 ⁱ	168.83 ± 3.229 ^a

ดังนั้นในการขึ้นรูปฟิล์มจึงเลือกเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะไม่บางหรือหนาจนเกินไป ไม่เปราะหรืออ่อนนุ่มจนเกินไป และไม่ขึ้นเหนียว (Figure 28) ซึ่งมีความหนาเท่ากับ 0.085 มิลลิเมตร ค่าการต้านทานแรงดึงเท่ากับ 1.781 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 76.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจะสามารถนำมาผลิตเป็นแผ่นฟิล์มสำหรับห่อหุ้มอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Judith และคณะ (2009) ที่ศึกษาการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus pentosus* พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ฟิล์มมีลักษณะไม่บางหรือหนาจนเกินไป ไม่เปราะหรืออ่อนนุ่มจนเกินไป โดยมีความหนาเท่ากับ 21 ไมโครเมตร ค่าการต้านทานแรงดึงเท่ากับ 15.15 mPa และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 116.69 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Shaw และคณะ (2002) ที่ศึกษาการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้ฟิล์มที่มีค่าการต้านทานแรงดึงเท่ากับ 3.5 mPa และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Jongjareonrak และคณะ (2006) ที่ศึกษาการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มจากเจลาตินที่แยกได้จากหนังปลา โดยพบว่าเจลาตินที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะไม่เปราะหรืออ่อนนุ่มจนเกินไป โดยมีค่าการต้านทานแรงดึงเท่ากับ 11.72 mPa และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 98.14 เปอร์เซ็นต์

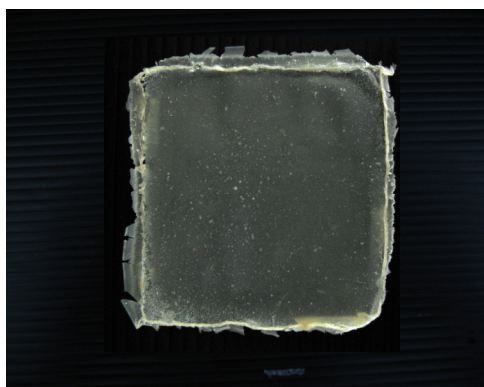


Figure 28. Appearance of film prepared from exopolysaccharide produced by *B. amyloliquefaciens* CNEP003 at concentrations of 4% with 20% glycerol.

8. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

8.1 การทำบริสุทธิ์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเทชัน (gel filtration chromatography) ชนิด Sephadex G-100

จากการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากข้อ 6 มาทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีไดอะไลซิสและทำให้เข้มข้นด้วยการทำแห้งแบบ freeze dry มาละลายให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี gel filtration chromatography ชนิด Sephadex G-100 ที่บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.0×45 เซนติเมตร และชะสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.3 ออกจากคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ในแต่ละหลอดมาวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด พบว่าสามารถแยกสารได้ 2 พีค คือ E1 และ E2 ดังแสดงใน Figure 29 โดยสามารถตรวจพบน้ำตาลทั้งหมดได้ในพีค E1 ทำการรวมสารละลายที่ได้ตั้งแต่หลอดที่ 6-15 จากนั้นนำไปทำการเอาเกลือออกโดยการทำไดอะไลซิสและนำไปทำแห้งแบบ freeze dry นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

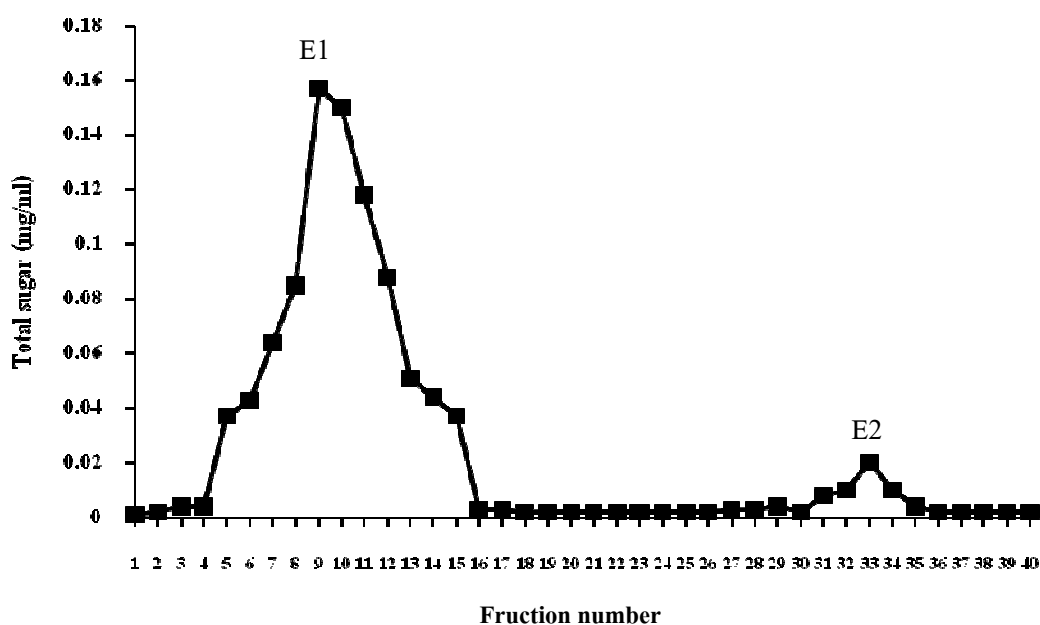
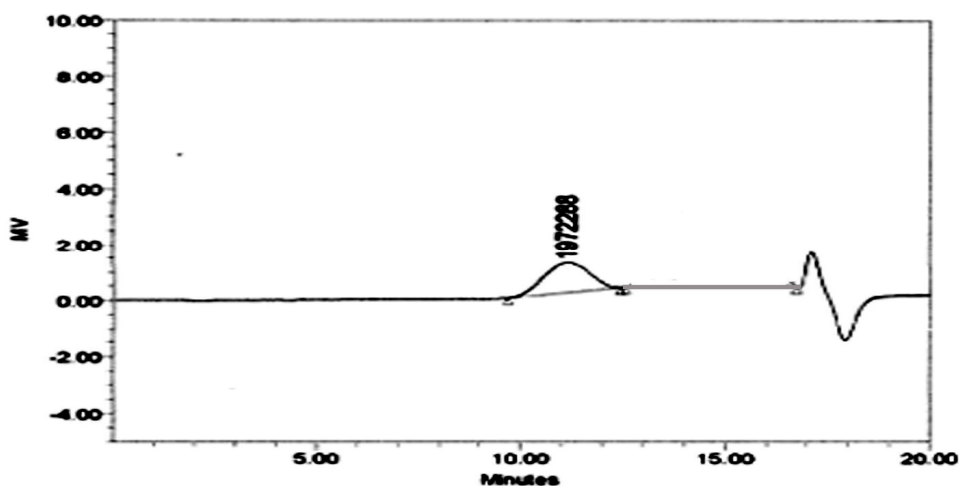


Figure 29. Purification profile of exopolysaccharide from *B. amyloliquefaciens* CNEP003 on Sephadex G-100

8.2 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC)

เมื่อนำเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาละลายใน 0.05 M sodium bicarbonate buffer (pH 11) แล้วกรองด้วย nylon 66 membrane (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ติดเข้าเครื่อง GPC ซึ่งมีพลูลูแลนเป็นตัวมาตรฐาน (5900-788000 ดาลตัน) (ภาคผนวก ค) โดยใช้ Ultrahydrogel linear และ guard column และใช้ Refractive Index Detector เป็นตัวจับสัญญาณ ด้วยอัตราเร็ว 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 นาที ผลการทดลองพบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.33×10^6 ดาลตัน (Figure 30) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. DP-152 คือ 2×10^6 ดาลตัน (Shu *et al.*, 1997) และมีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. I-450 คือ 2.2×10^6 ดาลตัน (Kumar *et al.*, 2004) น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์มีผลโดยตรงกับคุณสมบัติด้านความหนืดโพลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดมากกว่าพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Rew *et al.*, 2000)



Mn	Mw	Mp	Mz	Mz+1	Polydispersity
(Daltons)	(Daltons)	(Daltons)	(Daltons)	(Daltons)	
1651443	2327756	2151005	3149260	4005695	1.409529

Figure 30. GPC chromatogram of partially purified exopolysaccharide from *B. amyloliquefaciens* CNEP003.

8.3 ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ โดยวิธี Fourier-transform infrared (FT-IR) microscopy

เมื่อนำเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์เพื่อหาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 โดยใช้เทคนิค KBr (Pellet) และสภาวะที่ทดสอบคือช่วงคลื่น $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ จาก Figure 31 พบว่าหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากกราฟที่ปรากฏในความยาวคลื่นที่ 3413.95 cm^{-1} มีการยึดตัวของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ความยาวคลื่นที่ 2934.75 cm^{-1} พบการยึดตัวของหมู่เมทิล (methyl group; CH_3) ความยาวคลื่น 1631.76 cm^{-1} พบการยึดตัวของหมู่คาร์บอนิล (C=O) (Bramhachari and Dubey, 2006; Singh *et al.*, 2006) และที่ความยาวคลื่น $1000-1200 \text{ cm}^{-1}$ พบสัญญาณของสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต (C-O-C, C-O) (Bremer and Geesey, 1991) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการแปลผลของ IR (ภาคผนวก ค Table 18) ทำให้ทราบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีหมู่ไฮดรอกซิลและคาร์บอกซิลเป็น องค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์

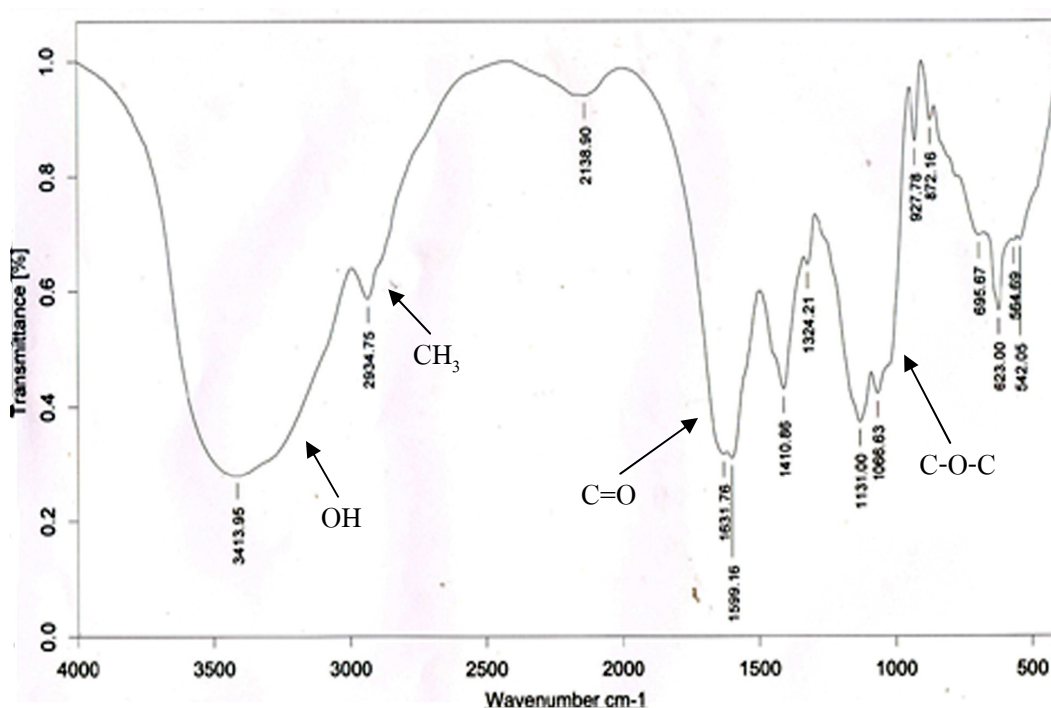


Figure 31. Infrared spectrum of exopolysaccharides from *B. amyloliquefaciens* CNEP003.

8.4 ศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ โดยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometry

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค NMR โดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย พบว่าสัญญาณที่ปรากฏใน 1H NMR มีความใกล้เคียงกับสัญญาณของกลูโคส จากสเปกตรัม 1H NMR ของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์พบสัญญาณของโปรตอนแอลดีไฮด์ (aldehyde proton: $-COH$) ที่ตำแหน่งค่า chemical shift ที่ 8.4 พีพีเอ็ม และที่ตำแหน่งค่า chemical shift ที่ 2.2-2.4 พีพีเอ็ม พบสัญญาณของโปรตอนไฮดรอกซิล (OH) ดังแสดงใน Figure 32

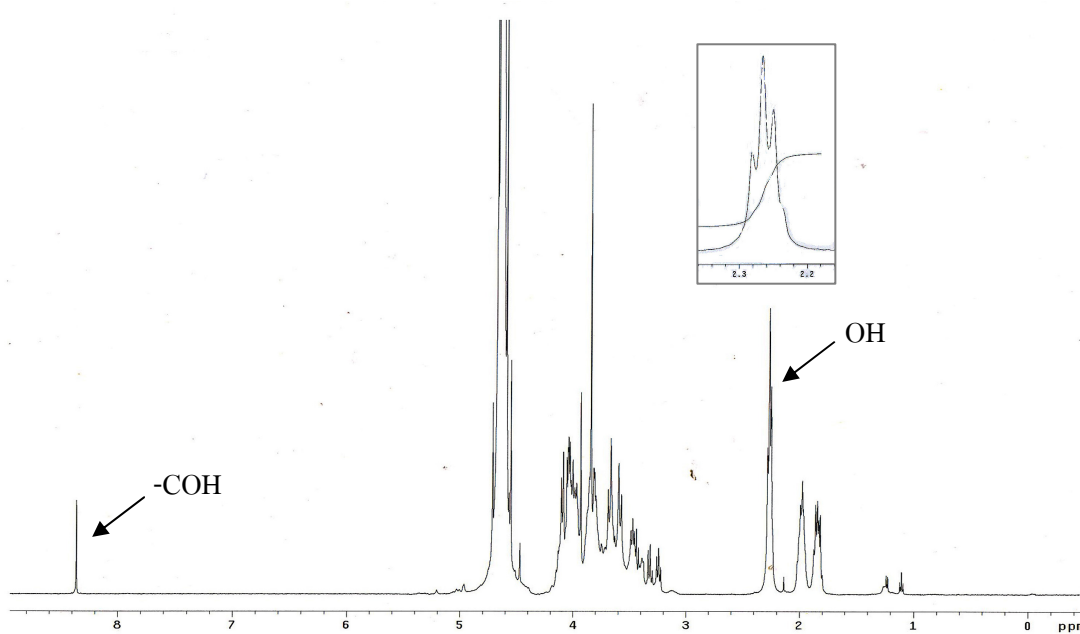


Figure 32. The 1H NMR spectrum of exopolysaccharides from *B. amyloliquefaciens* CNEP003 dissolved in D_2O .

8.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

จากการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย Dichloromethane: Acetonitrile: Acetic acid: Water ในอัตราส่วน 5: 3: 3: 1.5 โดยปริมาตร โดยมีน้ำตาลอะราบิโนส กลูโคส แมนโนส และไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน พบว่า TLC chromatogram ที่ตรวจสอบด้วย

anisaldehyde ของน้ำตาลมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดคือน้ำตาลอะราบิโนส กลูโคส แมนโนส และไซโลส มีค่า Retention factor (R_f) เท่ากับ 0.35, 0.26, 0.29 และ 0.46 ตามลำดับ ส่วนเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.26 และ 0.29 ซึ่งตรงกับค่า R_f ของน้ำตาลมาตรฐานกลูโคสและแมนโนส และเมื่อสังเกตสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของน้ำตาลมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด พบว่าน้ำตาลอะราบิโนส กลูโคส แมนโนส และไซโลส จะมีสีส้ม สีเขียว สีน้ำตาลเข้ม และสีน้ำตาลอ่อน ตามลำดับ และเมื่อสังเกตสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* CNEP003 พบว่าจะมีสีเขียวและสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งตรงกับสีของน้ำตาลมาตรฐานกลูโคสและแมนโนส ดังแสดงใน Figure 33

ดังนั้นจากการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ด้วยเทคนิค TLC พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถจัดจำแนกชนิดของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ดังกล่าวได้เป็น โพลิแซคคาไรด์ชนิดเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Barbara และคณะ (2002) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus thermantarcticus* 4001 พบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส ในอัตราส่วน 1:0.1 เช่นเดียวกับการทดลองของ Kae และคณะ (2002) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่แยกได้จากน้ำทะเล พบว่าเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. megaterium* มีน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไรโบสและไซโลส เป็นองค์ประกอบ

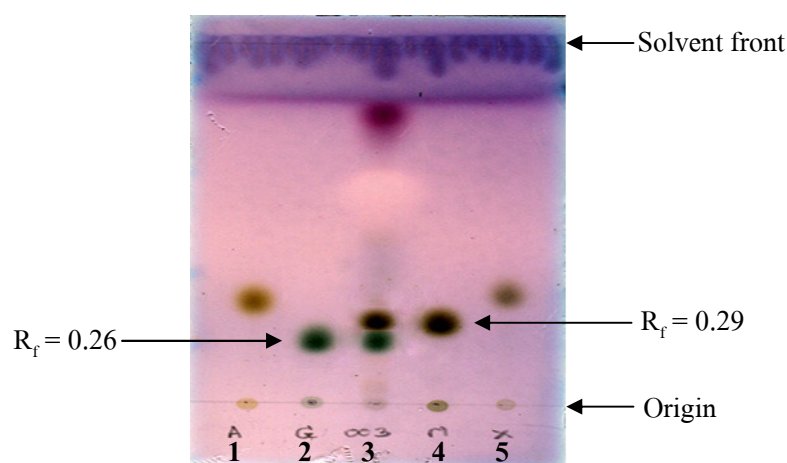


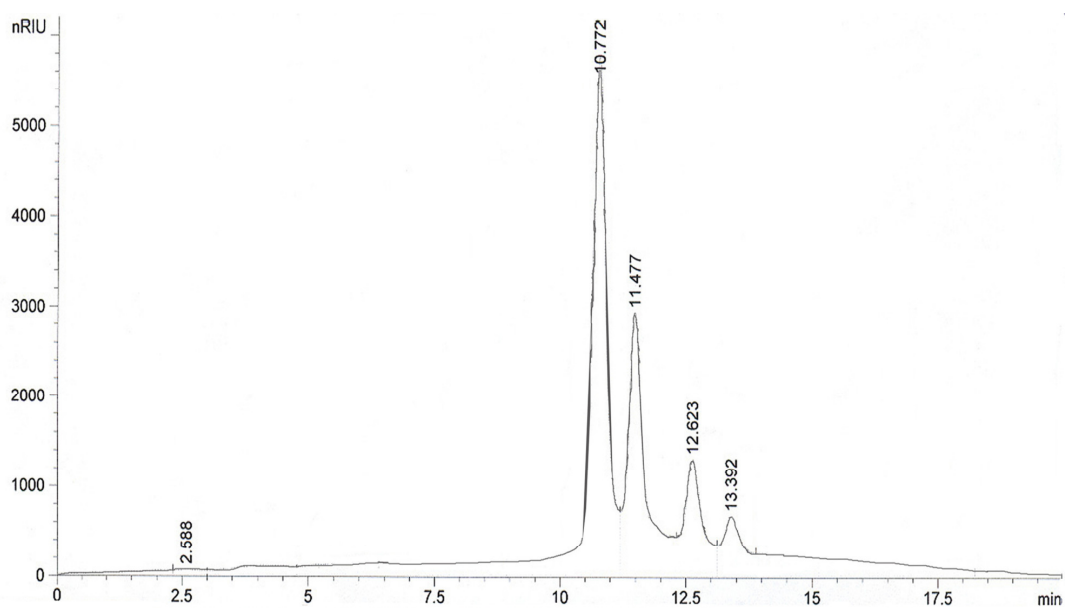
Figure 33. Thin layer chromatogram (TLC) of EPS samples (Lane 1: arabinose, Lane 2: glucose, Lane 3: hydrolysed EPS of *B. amyloliquefaciens* CNEP003, Lane 4: mannose and Lane 5: xylose).

8.6 ศึกษาองค์ประกอบและชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค HPLC โดยโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์แสดงดัง Figure 34 พบว่ามีพีค 4 พีค ซึ่งพีคที่ 1, 2 และ 3 มีค่า retention time เท่ากับ 10.772, 11.477 และ 12.623 นาที ซึ่งตรงกับน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส แมนโนส และอะราบีโนส (ภาคผนวก ค ใน Figure 38, 39 และ 40) มีพื้นที่ใต้พีคคิดเป็นร้อยละ 58.39, 28.18 และ 7.36 ของคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ ส่วนพีคที่ 4 มีค่า retention time เท่ากับ 13.392 นาที ซึ่งไม่ตรงกับน้ำตาลมาตรฐานชนิดใดเลย ซึ่งน่าจะเป็นสารปนเปื้อนอื่นที่เกิดจากการย่อยด้วยกรด (Smitinont *et al.*, 1999) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และอะราบีโนส จากผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค HPLC สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC จากข้อ 8.5 โดยเทคนิค HPLC บ่งชี้ว่าองค์ประกอบหลักของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์คือน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และอะราบีโนส ในขณะที่เทคนิค TLC ยืนยันว่ามีน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส แต่ไม่พบน้ำตาลอะราบีโนส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบีโนสในตัวอย่างอาจมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ซึ่งมีความไวในการวิเคราะห์น้ำตาลที่ต่ำกว่าเทคนิค HPLC

ดังนั้นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และอะราบีโนส เป็นองค์ประกอบ สามารถจัดจำแนกชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ดังกล่าวว่าเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ โดยที่โพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียที่มีองค์ประกอบคล้ายกันได้แก่รายงานของ Singh และคณะ (2006) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* BXO1 พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส กลูโคส และอะราบีโนส ในอัตราส่วน 3:2:0.1 เช่นเดียวกับการทดลองของ Maria และคณะ (1996) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus thermantarcticus* พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และอะราบีโนส ในอัตราส่วน 1:0.7:0.1 จากการรายงานโดยส่วนใหญ่ พบว่าแบคทีเรียจะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ซึ่งองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (De Vuyst and Degeest, 1999; Looisjesteijn *et al.*, 1999; Tallon *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005) เช่นการทดลองของ Gokcen และคณะ (2008) ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* G1 และ

Pseudomonas putida G12 พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* G1 ประกอบด้วยแมนโนสและกลูโคส ในอัตราส่วน 3:1 ในขณะที่เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *P. putida* G12 ประกอบด้วยกาแลกโทสและกลูโคส ในอัตราส่วน 2:0.5 เช่นเดียวกับการทดลองของ Grobber และคณะ (1997) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus debruekii* subsp. *blgaricus* NCFB 2772 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน พบว่าจากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วยกาแลกโทส กลูโคส และแมนโนส ในอัตราส่วน 5:1:1 ส่วนการใช้ฟรุกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วยกาแลกโทส กลูโคส และแมนโนส ในอัตราส่วน 11:1:0.4 เช่นเดียวกับการทดลองของ Torino และคณะ (2001) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus helveticus* ATCC15807 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีพีเอชต่างกัน พบว่าที่พีเอช 6.2 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลกโทส ในอัตราส่วน 1:1 ในขณะที่พีเอช 4.5 และ 5.0 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลกโทส ในอัตราส่วน 2:1



Retention	Area	Area %
10.772	1597.5970	58.3467
11.477	1112.5330	31.1531
12.623	265.9140	7.3432
13.392	98.5823	3.0570

Figure 34. HPLC chromatogram of exopolysaccharides produced by *B. amyloliquefaciens* CNEP003.

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างจากชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยรวมทั้งหมด 5 แห่ง เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีลักษณะเยิ้มและ/หรือหนืดได้ 76 ไอโซเลต เมื่อทำการแยกเชื้อบนอาหาร YPM, SWM และ ZMB จากการทดสอบขั้นต้นมีเพียง 19 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูง ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดให้เหลือเพียง 5 ไอโซเลต และเมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลตคือ CNEP003, CNEP012, CNEP070, CNEP071 และ CNEP079 มาเลี้ยงในอาหาร YPM, SWM และ ZMB พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหาร YMG โดยไอโซเลตที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดคือไอโซเลต CNEP003 ซึ่งแยกได้จากฟิล์มชีวภาพบนพลาสติกที่เก็บมาจากน้ำทะเลจากน้ำพุร้อน อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ โดยให้ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 3.07 กรัมต่อกรัมเซลล์

เมื่อนำเชื้อไอโซเลต CNEP003, CNEP012, CNEP070, CNEP071 และ CNEP079 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต CNEP003, CNEP070 และ CNEP071 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T (99 เปอร์เซ็นต์) ในทางตรงกันข้ามไอโซเลต CNEP012 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* NBRC13719^T (99 เปอร์เซ็นต์) ส่วนไอโซเลต CNEP079 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pseudoalteromonas ganghwensis* FR1302^T (98 เปอร์เซ็นต์)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัดความเข้มข้น 8.47 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พิเอช 7.5 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด

เมื่อศึกษาความเข้มข้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ผลิตได้ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นพลาสติกไซเซอร์ต่อการขึ้นรูปฟิล์ม พบว่าที่ความ

เข้มข้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ फिल्मมีลักษณะอ่อนนุ่มและมีความยืดหยุ่น ซึ่งสามารถวัดความหนาของแผ่นฟิล์มได้เท่ากับ 0.085 มิลลิเมตร ค่าความต้านทานแรงดึงเท่ากับ 1.781 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 76.92 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ชื่อ *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ผลที่ได้ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.33×10^6 ดาลตัน จากการวัดด้วย Gel permeation Chromatography (GPC) เมื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเครื่อง Fourier-transform infrared (FT-IR) พบว่าประกอบด้วยหมู่คาร์บอซิลิกและไฮดรอกซิล จากการวิเคราะห์โปรตอนที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) พบว่าสัญญาณที่ปรากฏใน ^1H NMR มีสัญญาณของโปรตอนแอลดีไฮด์ (aldehyde proton: -COH) และสัญญาณของโปรตอนไฮดรอกซิล (OH) และเมื่อวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *B. amyloliquefaciens* CNEP003 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และอะราบิโนส

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานวิจัยเกี่ยวกับโพลีเมอร์ชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. การประยุกต์ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์มควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม เพื่อจะได้นำไปผลิตเป็นแผ่นฟิล์มและนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. ควรมีการนำเอาเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ไปศึกษาต่อว่าสามารถนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในด้านใดได้อีกบ้าง เช่น การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหรือเชื้อรา เป็นต้น

3. การหาลำดับประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค FT-IR, ^1H NMR และ HPLC เป็นเพียงการหาลำดับประกอบคร่าวๆ แต่ไม่ทราบโครงสร้างอย่างละเอียดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เช่น พันธะที่ต่อกันของไซโลส ดังนั้นจึงควรมีทำการทดลองเพิ่มเติม เช่น การใช้ ^{13}C NMR เพื่อจะได้ทราบว่ามีการ์บอนอยู่ที่ไหนเพื่อจะได้ทราบอย่างแน่ชัดว่าเป็นน้ำตาลชนิดไหน และการใช้ GC-MS เพื่อหาพันธะที่ต่อกันของน้ำตาลไซโลส

เอกสารอ้างอิง

- จันทร์ทิพย์ คงสร. 2549. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถดูดซับตะกั่วโดยแบคทีเรียในทะเลสาบพันธุ์ CNBP001 และการประยุกต์ใช้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จุไรรัตน์ นันทานิช. 2546. แนวทางการใช้ไคติน ไคโตแซนในตำรับยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในเทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 (มานี เหลืองธนะอนันต์, บรรณาธิการ). หน้า 105-132. ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- Andrea, F. L., Soccol, T., Pandey A. and Soccol, R. C. 2007. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharides of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. Food Sci. 40: 30-35.
- Aslim, B., Beyatil, Y. and Yuksekdag, Z. N. 2006. Productions and monomer composition of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. J. Food Sci. Technol. 41: 973-979.
- Aslim, B., Yuksekdag, Z., Beyatli, N. and Mercen, N. 2005. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strain under different growth condition. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 673-677.
- ASTM. 1996. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard E96-95. In Annual book of ASTM standards, Vol. 4. p. 697-704. Philadelphia, PA, USA.
- Atkinson, B. 1983. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Stockton Press, New York.
- Arskold, E., Svensson, M., Grage, H., Roos, S., Radstrom, P. and van Niel, W. J. 2007. Environmental influence on exopolysaccharide formation in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. Int. J. Food Microbiol. 116: 159-167.

- Banker, G. S. 1996. Water vapor transsion properties of free polymer films. *J. Pharm. Pharmacol.* 18: 457-472.
- Banik, R. M., Santhiagu, A. and Upadhyay, S. N. 2007. Optimization of nutrients for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. *Biores. Technol.* 98: 792–797.
- Barbara, N., Licia, L., Adriana, P., Vincenzo, S. M., Ida, R. and Agata, G. 2002. Production and characterization of exopolysaccharides excreted by thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of flegrean ares (Italy). *Appl. Microbiol.* 25: 319-325.
- Beech, B. I. and Cheung, S. W. C. 1995. Interactions of exopolymer produced by sulphate-reducing bacteria with metals ions. *Int. Biodeter. Biodegr.* 95: 59-72.
- Bergo, P. and Sobral, P. J. A. 2007. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids.* 21: 1285-1289.
- Bertocchi, C., Delneri, D., Signore, S. and Weng, Z. 1997. Characterization of microbial cellulose from a high-producing mutagenized *Acetobacter pasteurianus* strain. *Appl. Microbiol.* 1336: 211-217.
- Bhaskar, P. V. and Bhosle, N. B. 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Curr. Sei India.* 25: 45-53.
- Bramhachari, P. V. and Dubey, S. K. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* stain VB23. *Appl. Microbiol.* 43: 571-577.
- Bremer, P. J. and Geesey, G. G. 1991. An evaluation of biofilms development utilizing non-destructive attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling.* 3: 89-100.
- Brierley, C. L. 2000. Metal Immobilization Using Bacteria. In *Microbial Mineral Recovery.* (Ehrlich, H.L. and Brierley, C.L., eds.) McGraw-Hill. 45: 302-339.

- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Ober, C. J. and Moineau, S. 2003. Biochemistry, genetic and application of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 86: 407-423.
- Bryan, B. A., Linhardt, R. J. and Daniels, L. 1986. Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella* sp. strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1304-1308.
- 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.
- Cakic, M. D., Nikolic, G. S. and Ilic, L. A. 2002. FT-IR spectra of iron (III) complexes with dextran, pullulan and inulin oligomers. *Bulletin Chem. Technol. Macedonia.* 21: 135-146.
- Calsteren, M. R. V., Pau-robot, C., Begin, A. and Roy, D. 2002. Structure determination of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. J. *Biochem.* 363: 7-17.
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. and Topisirovic, L. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3914-3919.
- Chi, Z., Fang, Y., 2005. Exopolysaccharides from marine bacteria. *J. Ocean Univ. China.* 14: 67-74.
- Chi, Z., Su, C. D. and Lu, W. D. 2007. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. *Biores. Technol.* 98: 1329-1332.
- Chin, H. S. and Ming, Y. L. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem.* 39: 931-937.

- Concetta, G., Teresa, L. M., Daniela, C. and Erko, S. 2003. *Bacillus aeolius* sp. nov. a novel thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from eolian islands (Italy). Appl. Microbiol. 26: 172-176.
- Crescenzi, V. 1995. Microbial polysaccharides of applied interest: Ongoing research activities in Europe. Biotechnol. Prog. 11: 251-259.
- Degeest, B. and De Vuyst, L. 1999. Indication that nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modeling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2863-2870.
- Degeest, B. and De Vuyst, L. 2000. Correlation of activities of the enzyme α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3519-3527.
- Degeest, B., Janssens, B. and De Vuyst, L. 2001. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. J. Appl. Microbiol. 91: 470-477.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. 23: 153-177.
- Donald, V. and Judith, G. V. 2004. Biochemistry. Vol. 3. 3rd Ed. John wiley & sons, INC. USA.
- Dubios, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Dupont, I., Roy, D. and Lapointe, G. 2000. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. J. Ind. Microbiol. 24: 251-255.

- Fang, Q. H. and J. J. Zhong. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentaton of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 37: 769.
- Gandhi, H. P., Ray, R. M., Patal, R. M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydr. Polym.* 34: 323-327.
- Geesey, G. G. and Jang, L. 1989. Extracellular polymer of metal biding. *In Bacterial Interactions with Metallic Ions.* (Beveridge, T. J. and Doyle, J. R.). p. 223-247. John Wiley & Sons. New York.
- Gerald, R. and Tilak, W. N. 1991. Yeast- Derived Products. *In Yeast Technology.* (Gerald, R. and Tilak, W. N.). p140-144. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Gokcen, Y. C., Belma, A. and Yavuz B. 2007. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydr. Polym.* 73: 178-182.
- Grobben, G. J., Sikkema, J., Smith, M. R. and de Bont, J. A. M. 1995. Production of extracellular chemically defined medium. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 103-107.
- Grobben, G. J., Van Casteren, W. H. M., Schols, H. A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M. R., Sikkems, J. and De Bont, J. A. M. 1997. Analysis of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus debruekii* subsp. *blgaricus* NCFB 2772 grown in continous culture on glucose and fructose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 516-532.
- Guezennec, J. 2002. Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 204-208.
- Guibert, S. 1986. *Technology and Application of Edible Protective Films.* Elsevier Applied Science Publishing Co., London. 68: 439-545.

- Guilbert, S., Gontard, N. and Gorris, L. G. M. 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm-Wiss u. Technol.* 29: 10-17.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 765-768.
- Hanlon, G. W., Denyer, S. P., Olliff, C. J. and Ibrahim, L. J. 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2746-2753.
- Himanslm, P. G., Ramesh, M. R. and Rajni, M. P. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydr. Polym.* 34: 323-327.
- Hong, K. L., Jongsik, C., Eun, Y. M., Song, H. K., Deuk, S. L. and Kyung, S. B. 2001. *Hahella chejuensis* gen nov sp. nov an extracellular polysaccharide producing marine bacterium. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51: 661-666.
- Jayaraman, M. and Seetharaman, J. 2002. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Process Biochem.* 38: 841-847.
- Jolly, L., Sebastien, J. S. F., Duboc, P. and Neeser, J. R. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 367-374.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M. 2006. Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 229-235.
- Judith, A. P., Adriana, P., Mari, A. G. and Anali, G. A. 2009. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids.* 23: 684-690.

- Kae, K. K., Hyun, S. L., Sung, Y. J., Joung, H. Y., Jung, H. L. and Hong, K. L. 2002. Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. *J. Microbiol.* 42: 260-266.
- Kester, J. J. and Fennema, O. R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technol.* 40: 47-59.
- Khanafari, A. and Akhavan Sepahei, A. (2007) Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 4: 427-432.
- Kim, D., Yang, D., Oark, J., Cho, S., Suralit, D., Yunand J. and Song, C. 2001. Production of hypoglycemic, extracellular polysaccharide from submerged culture of mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol.* 23: 513-517.
- Kim, B. K., Leea, B. H., Leeb, Y. J., Jina, I. H., Chunga, C. H. and Lee, J. W. 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enz. Microbiol. Technol.* 44:411-416.
- Kim, K. W., Ko, C. J. and Park, H. J. 2002. Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylate starch-based edible films. *J. Food Sci.* 67: 218-222.
- Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S. and Yamaguchi, T. 1991. Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, "villi". *Anim. Sci. Tech.* 62: 277-283.
- Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Miura, M., Saito, T. and Itoh, T. 1993. B-cell mitogen produced by slime forming, encapsulated *Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk, villi. *J. Dairy Sci.* 76: 1514-1519.
- Ko, S. H., Lee, H. S., Park, S. H. and Lee, H. K. 2000. Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnol. Bioprocess.* 5: 181-185.

- Korakli, M. and Vogel, R. F. 2006. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosucrase and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 790-803.
- Krochta, J. M. 2000. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2687-2692.
- Kudryashova, O. A. and Yurlova, N. A. 2000. Effect of nitrogen source on the biosynthesis, composition, and structure of the exopolysaccharides of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Microbiol.* 69: 428-435.
- Kumar, C. G., Joo, H. S., Choi, J. W., Koo, Y. M. and Chang, C. S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp.I-450. *Enz. Microbiol. Technol.* 34: 673-681.
- Kyung, H. L., Sang, H. Y., Seung, H. B. and Hyeon, G. L. 2007. Physicochemical and biological characteristics of DEAE-derivatized PS7 biopolymer of *Beijerinckia indica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 141-145.
- Lato, M., Brunelli, B. and Ciuffini, G. 1968. Thin-layer chromatography of carbohydrate on silica gel impregnated with sodium acetate monosodium phosphate. *J. Chromatogr.* 39: 407-417.
- Laws, A., Gu., Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 19: 597-625.
- Lee, K. Y., Shim, J. and Lee, H. G. 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydr. Polym.* 56: 251-254.
- Lee, Y. I., Seo, T. W., Kim, K. M., Ahn, G. S., Kwon, S. G. and Park, H. Y. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharides by *Bacillus polymyxa*. *Bioproc. Eng.* 16: 71-75.

- Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszkeski, J. M., Strecker, G., Favre, N. And Neeser, J. R. 1997. Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3512-3518.
- Lewis, M. J. 1996. Viscosity. *In Physical Properties of Foods and Food Processing Systems.* p. 108-136. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Lin, T. Y. and Chien, M. F. C. 2005. Exopolysaccharide production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem.* 100: 1419-1423.
- Lin, Y., Zhang. and Thibault, J. 2007. *Aureobasidium pullulans* batch cultivations based on a factorial design for improving the production and molecular weight of exopolysaccharides. *Process Biochem.* 42: 820-827.
- Linton, J. D., Ash, S. G. and Huybrechts, L. 1991. Microbial Polysaccharide, *In Biomaterials Novel Materials from Biological Source* (ed.D. Byrom) pp. 215-262. Great Britain : Macillan Publisher Ltd.
- Looijesteijn, P. J., Boels, I. C., Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 5003-5008.
- Looijesteijn, P. J. and Hugenholtz, J. 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 178-182.
- Ludbrook, K. A., Russell, C. N. and Greig, R. I. 1997. Exopolysaccharide production from lactic acid bacteria isolate from fermented foods. *J. Food Sci.* 62: 597-604.
- Macedo, M. G., Lacroix, C., Garder, N. J. and Champagne, C. P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW9595M in whey permate. *Int. Dairy. J.* 12: 419-426.

- Makoto, U., Hiroshi, Y., Hiroshi, A., Jun, O., Noriyuki, I., Shigeaki, H., Michio, S. and Mutsuyasu, N. 2007. Structural analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohyd. Res.* 342: 933–942.
- Makoto, U., Hiroshi, Y., Hiroshi, A., Jun, O., Noriyuki, I., Shigeaki, H., Michio, S. and Mutsuyasu, N. 2007. Structural analysis of mucoidan an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristine assimilating marine bacterium *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohyd. Res.* 342: 927–932.
- Makoto, U., Tomoko, A., Hiroshi, A., Jun, O., Noriyuki, I., Brett, N., Iain, C., Mutsuyasu, N. and Michio, S. 2006. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzene tolerant bacterium, *Rhodococcus* sp. 33. *Carbohyd Res.* 341: 616–623.
- Makoto, U., Tomoko, A., Hiroshi, A., Jun, O., Noriyuki, I., Brett, N., Iain, C., Michio, S. and Mutsuyasu, N. 2006. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2. *Carbohyd. Res.* 341: 766–775.
- Malcolm, B. P., Leann, L. M., Marianna, A. P. and Evgeny, V. 2007. The structure of the exocellular polysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. RHA1. *Carbohyd. Res* 342: 2223–2229.
- Mancuso Nichols, C. A., Guezennec, J. and Bowman, J. P. 2005. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents. *Marine Biotechnol.* 7: 253-271.
- Maria, C. M., Licia, L., Roberta, I., Enrico, E., Agata, G. and Barbara, N. 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3265-3269.
- Martensson, O., Duenas-Chasco, M., Irastorza, A., Oste, R. and Holst, O. 2003. Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria

- strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 36: 353–357.
- McKellar, R. C., van Geest, J. and Cui, W. 2003. Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter*. *Food Hyd.* 17: 429-437.
- Methacanon, P., Madla, S., Kirtikara, K. and Prasitsil, M. 2005. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymer. *Carbohydr. Polym.* 60: 199-203.
- Monson, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Simen, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11: 675-686.
- Morikawa, M., Kagihiro, S., Haruki, M., Takano, K., Branda, S., Kolter, R. and Kanaya, S. 2006. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces polyglutamate. *Microbiol.* 152: 2801-2807.
- Morin, A. 1998. Screening of polysaccharide producing influencing the production, and recovery of microbial polysaccharides. *Agri-Food Canada.* 54: 275-296.
- Muralidharan, J. and Jayachandran, S. 2002. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Process Biochem.* 38: 841-847.
- Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robiniw, C. F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. *In* Method for General and Molecular Bacteriology. American Society Microbiol. Michigan. 5: 21-41
- Nakagawa, Y., Suzuki, M. and Hatano, K. 2001. Phylogenetic diversity of *Cytophaga*-like strains isolated from the sub-tropical zone of Japan. *Inst. Ferm. Res. Commun.* 20: 61-72.
- Nampoothiri, M. K. S. Rani, R., Sabarinath, C. and Pandey, A. 2003. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochem.* 38: 1513-1519.

- Patil, S. V., Bathe, G. A., Patil, A. V. and Salunkea, B. K. 2009. Production of bioflocculant exopolysaccharide by *Bacillus subtilis*. *Adv. Biotech.* 1: 14-17.
- Pawadee, M., Siribhorn, M., Kanyawim, K. and Malinee, P. 2005. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. *Carbohydr. Polym.* 60: 199–203.
- Pawlik, J. R. 1993. Marine invertebrates chemical defenses. *Chem. Rev.* 93: 1911-1922.
- Prasertsan, P., Wichienchot, S., Doelle, H. and Kennedy, J. F. 2008. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydr. Polym.* 71: 468-475.
- Revilla-Nuin, B., Rodriguez, A., Leandro, B., Ferrero, A. M. and Reglero, A. 1998. Regulation of capsular polysialic biosynthesis by *N*-acetyl-D-mannosamine, an intermediate of sialic acid metabolism. *FEBS Lett.* 426: 191-195.
- Rew, Y. H., Jo, W. S., Jeong, K. C., Yoon, J. T. and Choi, B. S. 2000. Cultural characteristics and fruiting-body formation of *Phellinus gilvus*. *J. Mycol.* 28: 6-10.
- Rodrigues, L. K., Caputo, G. G. L., Caevalho, J. C. T., Evangelista, J. and Schneedorf, J. M. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *Inter. J. Antimicrob.* 25: 404-408.
- Romero-Bastida, C. A., Martin-Polo, M. O., Velazquez, G. and Torres, J. A. 2004. Effect of plasticizer, pH and hydration on the mechanical and barrier properties of zein and ethylcellulose films. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 4: 251-256.
- Rougeaux, H., Guezennec, J., Carlson, R. W., Kervarec, N., Pichon, R. and Talaga, P. 1999. Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.* 315: 273-285.
- Ruas- Madiedo, P. and de los Reyes-Gavilan, C. G. 2005. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88: 843-856.

- Rud, T., Sterritt, R. M. and Lester, J. N. 1984. Formation and condition stability constants of complexes formed between heavy metals and bacterial extracellular polymer. *Wat. Res.* 18: 379-384.
- Salehizadeh, H. and Shojaosadati, S. A. 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produce from *Bacillus firmus*. *Wat. Res.* 37: 4231-4235.
- Saravanan, P. and Jayachandran, S. 2007. Preliminary characterization of exopolysaccharides produced by a marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* (SBT 033), *J. compilation.* 58: 235-243.
- Schiano Moriello, V., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Gambacorta, A. and Niclaus, B. 2003. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean aras. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 95-101.
- Seo, E. J., Yoo, S. H., Oh, K. W. and Cha, J. 2004. Isolation of an exopolysaccharide-producing bacterium, *Sphingomonas* sp. CS101, which forms an unusual type of sphingan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1146-1148.
- Shaw, N. B., Monahan, F. J., O’Riordan, E. D., and O’Sullivan, M. 2002. Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol or sorbitol. *J. Food Sci.* 67: 164-167.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J. and Hsieh, C. Y. 2005. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8211-8215.
- Shingel, I. K. 2002. Determination of structural peculiarities of dextran, pullan γ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 337: 1145-1451.
- Shivakumar, S. and Vijayendra, S.V.N. 2006. Production of exopolysaccharides by *Agrobacterium* sp. CFR-24 using coconut water – a byproduct of food industry. *Food Microbiol.* 42: 477-482.

- Shu, C. H., Li, D. Q. and Gu, L. K. 1997. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. *J. Ferment. Bioeng.* 184: 108-112
- Shu, C. H. and Lung, M. Y. 2003. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharides by *Antrodia camphorate* in batch cultures. *Process Biochem.* 4: 1-7.
- Silva, M. A., Bierhalz, A. C. K. and Kieckbusch, T. G. 2009. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydr. Polym.* 77: 736-742.
- Silvia, M. B. and Crispin, H. G. 2006. Optimization of polysaccharides production by bacteria isolated from soil. *J. Microbiol.* 37: 296-301.
- Singh, V. B., Kumar, A., Isaac Kirubakaran, S., Ayyadurai, R., Sunish Kumar, R. and Sakthivel, N. 2006. Comparison of exopolysaccharides produced by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains, BXO1 and BXO8 that show varying degrees of virulence in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Phytopathol.* 154: 410-413.
- Sinha, J., Bae, J. T., Park, J. P., Kim, K. H., Song, C. H. and Yun, J. W. 2001. Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:88-92.
- Sletmoen, M., Naess, S. N. and Stokke, B. T. 2009. Structure and stability of polynucleotide-(1,3)-b-D-glucan complexes. *Carbohydr. Polym.* Article In Press.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M. and Cescutti, P. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 105-111.
- Sriporaya, K. 1993. The relationship of manganese oxidation and zine adsorption by immobilized cells of *Pedomicrobium manganicum* in a continuous recycle fluidized bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 324-330.

- Sudhamani, S. R., Tharanathan, R. N. and Prasad, M. S. 2004. Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. Carbohydr. Polym. 56, 423 -427.
- Sutherland, I. W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Camb. Stud. Biotechnol. 9: 1-151.
- Sutherland, W. 1998. Novel and established application of microbial polysaccharides. Trend. Biotechnol. 16: 41-46.
- Tada, T., Matsumoto, T. and Masuda, T. 1998. Structure of molecular association of curdlan at dilute regime in alkaline aqueous systems. Chem. Phys. 228: 157-166.
- Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Res. Microbiol. 154: 705-712.
- Torino, M. I., Taranto, M. P., Sesma, F. and Font De Valdez, G. 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* AtCC 15807 in response to environmental pH. Appl. Environ. Microbiol. 91: 846-852.
- Van den Berg, D. J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamering, J. D., Vliegthart, J. F. G., Ledebuer, A. M. and Verrips, C. T. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* O-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.
- Van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L. and van Geel-Schutten, I. G. H. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. Microbiol. Mol. Biol. R. 70: 157-176.
- Vishal S., Arabinda R., Nikki G. and Datta M. 2000. Characterization of the extracellular polysaccharids produced by a marine *Cyanobacterium*, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and exploitation toward metal removal from solutions. Curr. Sei. 40: 274-278.

- Vuys, L. D., Vanderveken, F., Van de Ven, S. and Degeest, B. 1997. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1059-1068.
- Weiner, M. R. 1997. Biopolymers from marine prokaryotes . *J. Mar. Biotechnol.* 15: 390-394.
- Yunmian, H., Chunhui, L., Yuxing, C., Ancheng, J., Zilong, S., Tao, X. and Quansheng, Y. 2007. Isolation and structural characterization of a novel polysaccharide prepared from *Arca subcrenata* Lischke. *Biosci. Bioengin.* 104: 111-116.
- Zehra, N. Y. and Belma, A. 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Braz. Arch. Boil. Technol.* 51: 581-585.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตเอ็กซ์โพลิแซคคาไรด์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPM (ดัดแปลงมาจาก Shivakumar and Vijayendra, 2005)

ซูโครส	20 กรัม
ยีสต์สกัด	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นลงไป 15 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ SWM (ดัดแปลงมาจาก Jayaraman *et al.*, 2002)

เปปโตน	10.0 กรัม
เนื้อสกัด	10.0 กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นลงไป 15 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ZMB (ดัดแปลงมาจาก Kae *et al.*, 2002)

เปปโตน	1.0 กรัม
ยีสต์สกัด	1.0 กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นลงไป 15 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยใช้วิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย I

สารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

2. สารละลาย II

เตรียม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย sodium potassium tartrate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3. สารละลายอัลคาไรค์คอปเปอร์ (alkaline copper solution)

เตรียมโดยผสมสารละลาย I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย II ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมก่อนใช้

4. Folin-ciocateu's reagent

เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 อย่างรวดเร็วก่อนใช้

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไรค์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม folin-ciocateu's reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าทันที ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin

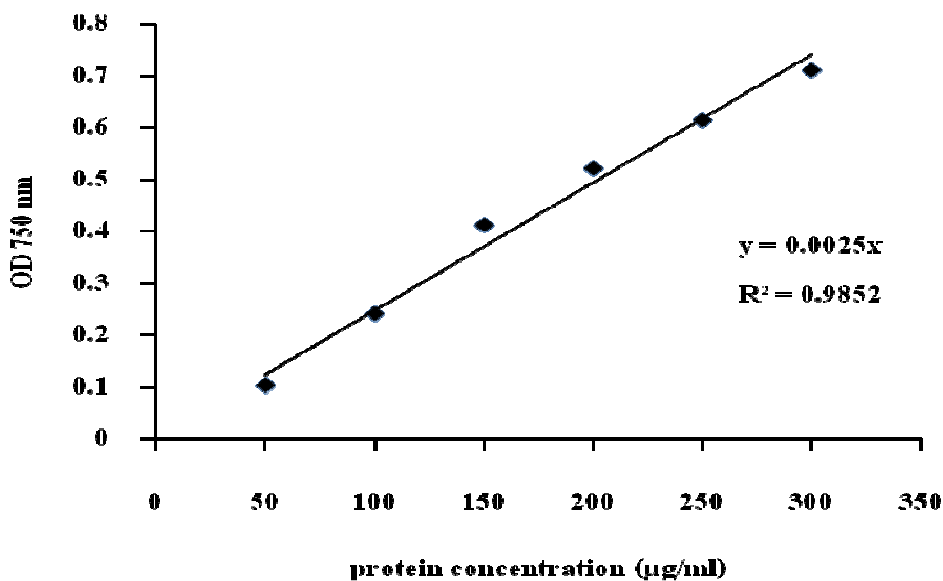


Figure 35. Standard curve of protein by Lowry method.

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10, 35, 50 และ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ให้สัมผัสกับสารละลายโดยตรงอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 100 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

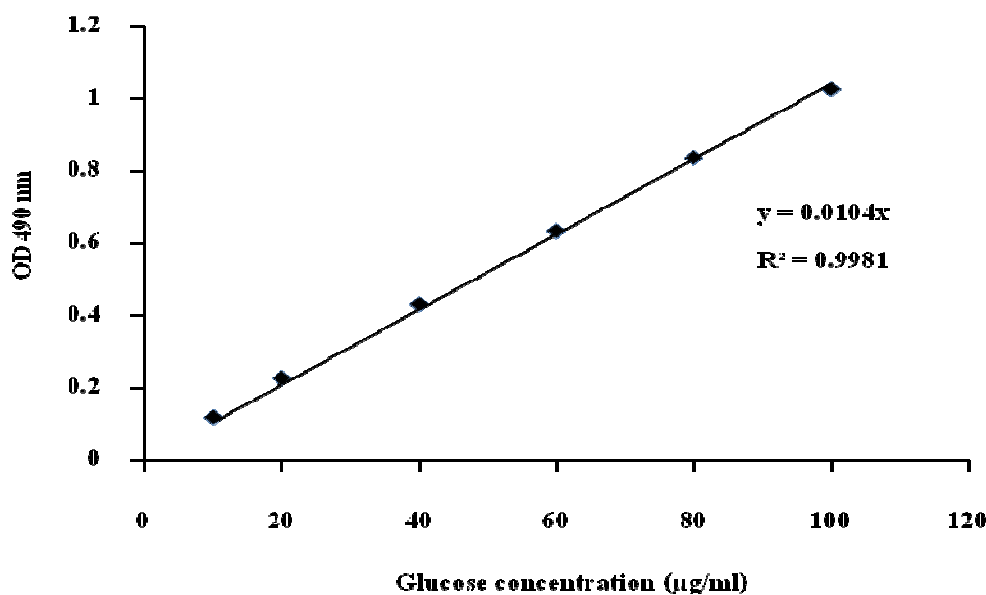


Figure 36. Standard curve of total sugar by phenol-sulfuric method.

3. การเตรียมสาร anisaldehyde

ผสม anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. การหาค่าความหนืด

เตรียมสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ โดยนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นโดยใช้ spatula คนจนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ละลายหมดจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน แล้วเทสารละลายเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ 10 มิลลิลิตร ลงในกระบอกวัดตัวอย่าง นำมาวัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield Digital Viscometer โดยใช้หัวเบอร์ 18 จากนั้นเลือกความเร็วรอบโดยยึดค่า % torque ในช่วง 30-90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นเกณฑ์ในการเลือกค่าความหนืดที่วัดได้ เพราะในช่วงดังกล่าวค่าความหนืดที่ได้ถือว่าเป็นค่าที่เชื่อถือได้ และบันทึกค่าความหนืดที่ปรากฏบนหน้าจอ

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

Table 17. Isolates, medium, source and location for the isolation marine bacteria producing exopolysaccharides.

Isolates	Medium	Source	Location
CNEP001	SWM	Algae	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP002	SWM	Rock	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP003	YPM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP005	SWM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP007	SWM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP008	SWM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP009	SWM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP011	YPM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP012	YPM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP013	YPM	Rock	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP014	YPM	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP015	ZMB	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP016	ZMB	Plastic	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP017	ZMB	Shell	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP018	ZMB	Sea water	Seawater hot spring, Karbi province
CNEP019	ZMB	Algae	Fossil Records, Karbi province
CNEP020	ZMB	Coral	Fossil Records, Karbi province
CNEP021	ZMB	Rock	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP022	ZMB	Shell	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP023	ZMB	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP024	ZMB	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP025	ZMB	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP026	ZMB	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province

Table 17. (cont.)

Isolates	Medium	Source	Location
CNEP027	YPM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP028	YPM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP029	YPM	Shell	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP030	YPM	Shell	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP031	YPM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP032	YPM	Rock	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP033	YPM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP034	YPM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP035	YPM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP036	YPM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP037	YPM	Rock	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP038	YPM	Shell	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP039	YPM	Shell	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP040	YPM	Shell	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP041	YPM	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP042	YPM	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP043	YPM	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP045	YPM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP046	YPM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP047	YPM	Sponge	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP048	YPM	Sponge	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP049	YPM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP050	YPM	Algae	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP051	SWM	Shell	Fossil Records, Karbi province
CNEP052	SWM	Metal	Fossil Records, Karbi province
CNEP053	SWM	Algae	Fossil Records, Karbi province
CNEP054	SWM	Algae	Fossil Records, Karbi province
CNEP055	SWM	Coral	Fossil Records, Karbi province

Table 17. (cont.)

Isolates	Medium	Source	Location
CNEP056	SWM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP057	SWM	Shell	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP058	SWM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP059	SWM	Rock	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP060	SWM	Rock	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP061	SWM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP062	SWM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP063	SWM	Plant	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP064	SWM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP065	SWM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP066	SWM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP067	SWM	Plastic	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP068	SWM	Algae	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP069	SWM	Rock	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP070	YPM	Shell	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP071	YPM	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP072	SWM	Metal	Pak Meng Beach, Trang province
CNEP073	SWM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP074	SWM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP075	SWM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP076	SWM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP077	SWM	Rock	Phang-nga Bay, Phangnga province
CNEP078	SWM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP079	YPM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province
CNEP080	SWM	Sand	Sarasin Bridge, Phuket province

16S rDNA gene sequences of marine bacterial isolates**1) CNEP003**

CTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACC
TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGG
TTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG
TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCC

2) CNEP012

CCAGGCAGCGGGCTATATGCAGTCGAGCGGAAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAG
GTGGCTTCCGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA
AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
CCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCA
ATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT
AGGAGCCCGCCCAAGTGACGAAGGGTGG

3) CNEP070

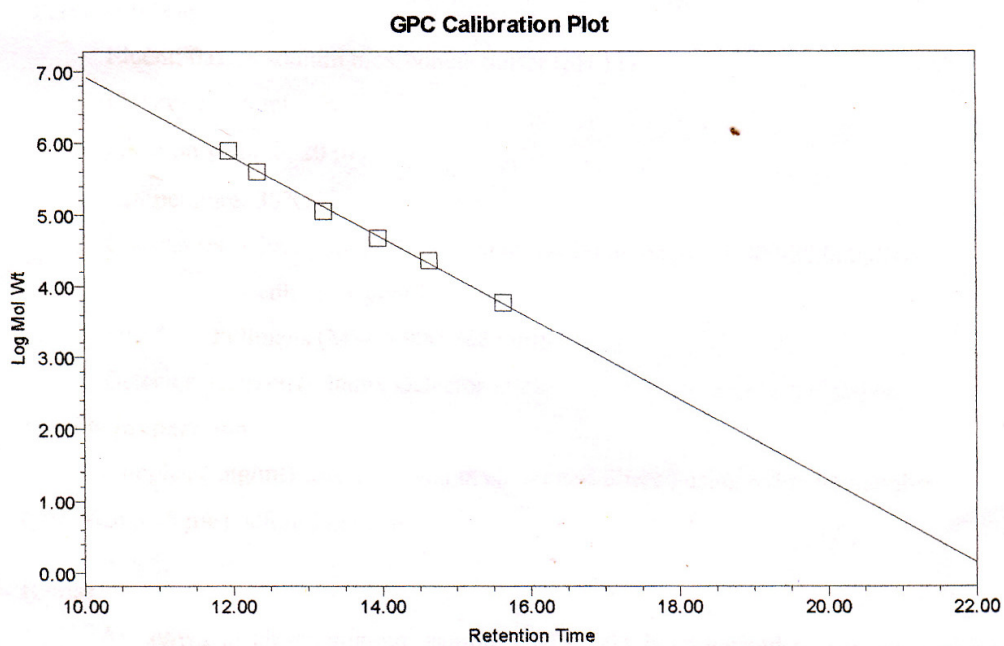
GGAGCGGGGCTATCTGCAGTCGAGCGGACGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTG
GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTAC
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAG
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAC
ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTA
GGAGCCGCCGCGAAGTGACGAAGCGG

4) CNEP071

GGGCGAGCTGGGCTATCTGCAGTCGAGCGGACGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAG
GTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATGGGAAACTGGGGAACCTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA
AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCA
ATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT
TTGAGCCGCCCGAAGTGACGAATGAAA

5) CNEP079

GGGCGATGCGAGCTAAATGCAGTCGAGCGGTAAAGAGAGTAGCTTGCTACTCTGCTG
ACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTATGGTGGGGGACAAC
AGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTC
GGGCCTCACGCCATAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC
TCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACT
TTCAGTAAGGAGGAAAGGTTAAGTGTTAATAGCACTTAGCTGTGACGTTACTTACAG
AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGA
AAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCCGAACTGGCAAAGTAGAGTGTGAAAG
AGGGGGGGAGAATTCAGGGGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAAGAATACC
GATGGCGAAGGCAGCCACCGGGGTCAACACTGACGCTTCATGTACGAAAGCGTGGG
AGAGCAAACAGGAGTAGGATACCCGGGTAGTCCACGCCGTAACGAGGTCTACTAG
AAGCTCGGGTCTTCGGACTTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGA
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACA
GAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
CTATCCTTAGTTGCCAGCGATTTCGGTCCGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGTGCTGCGAACCTGCGAGGGTAAGCGAATCACT
TAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGCGTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC
CGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGATAGTCTAACTTGCGGAG
GACGTCACCGCGAGGTACGGGCTCC



Mol Wt (Daltons)	Retention Time (min)	Log Mol Wt
788000	11.950	5.896526
404000	12.333	5.606381
112000	13.223	5.049218
47300	13.952	4.674861
22800	14.632	4.357935
5900	15.631	3.770852

Figure 37. Standard curve of pullulan by Gel Permeation Chromatography.

Table 18. Major functional groups of exopolysaccharides observed with FT-IR.

Wave number (cm^{-1})	Functional group	Functional type	Reference
36700-3230	OH (hydroxyl)	OH in polymeric compound	Singh <i>et al.</i> , 2006
3230-3000	CH_3 , C=H		Singh <i>et al.</i> , 2006
2950-2900	C-H stretching		Singh <i>et al.</i> , 2006
2900-2850	C-H stretching		Singh <i>et al.</i> , 2006
1750-1740	C=O	Carboxylic acid	Singh <i>et al.</i> , 2006
1670-1650	C-H and C=O	Amide I (protein peptidic bond)	Bramhachari and Dubey, 2006
1550-1535	C-N and N-N	Amide II (protein peptidic bond)	Bramhachari and Dubey, 2006
1470-1460	CH_2		Bramhachari and Dubey, 2006
1410-1400	C=O and OH	Carboxylic acid Alcohols and phenols	Bramhachari and Dubey, 2006
1200-1000	C-O-C	Polysaccharides	Bremer and Geesey, 1991
<1000	“ Fingerprint” Zone	Phosphate or sulphur functional groups	Bremer and Geesey, 1991

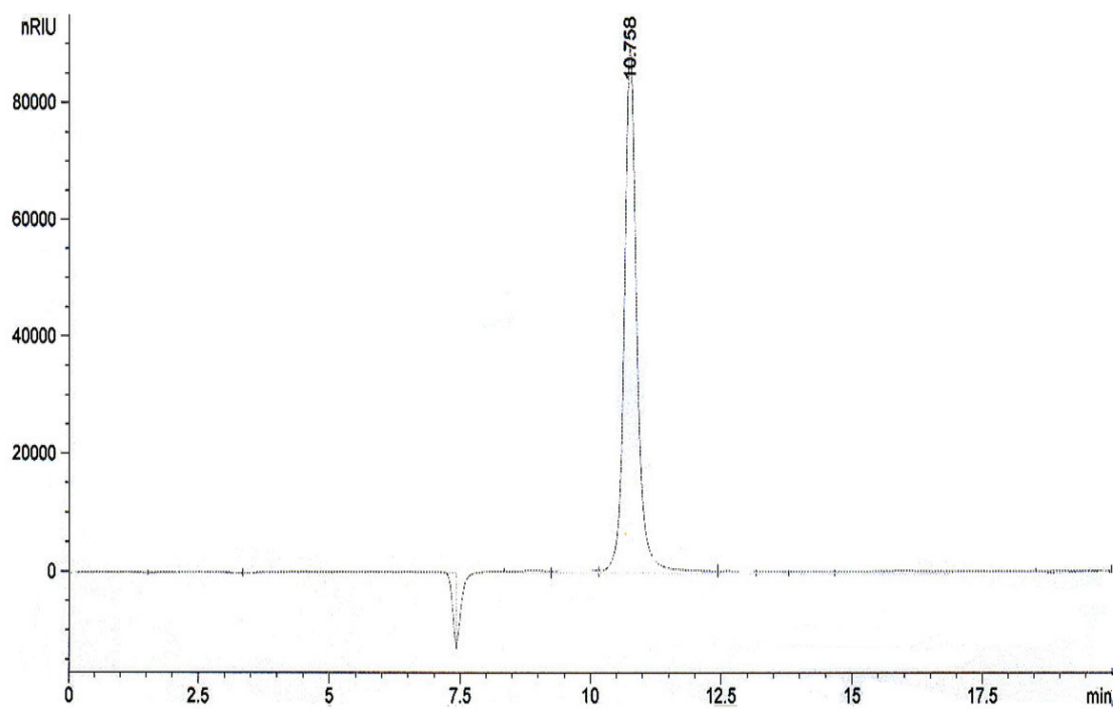


Figure 38. HPLC chromatogram of standard glucose sugar.

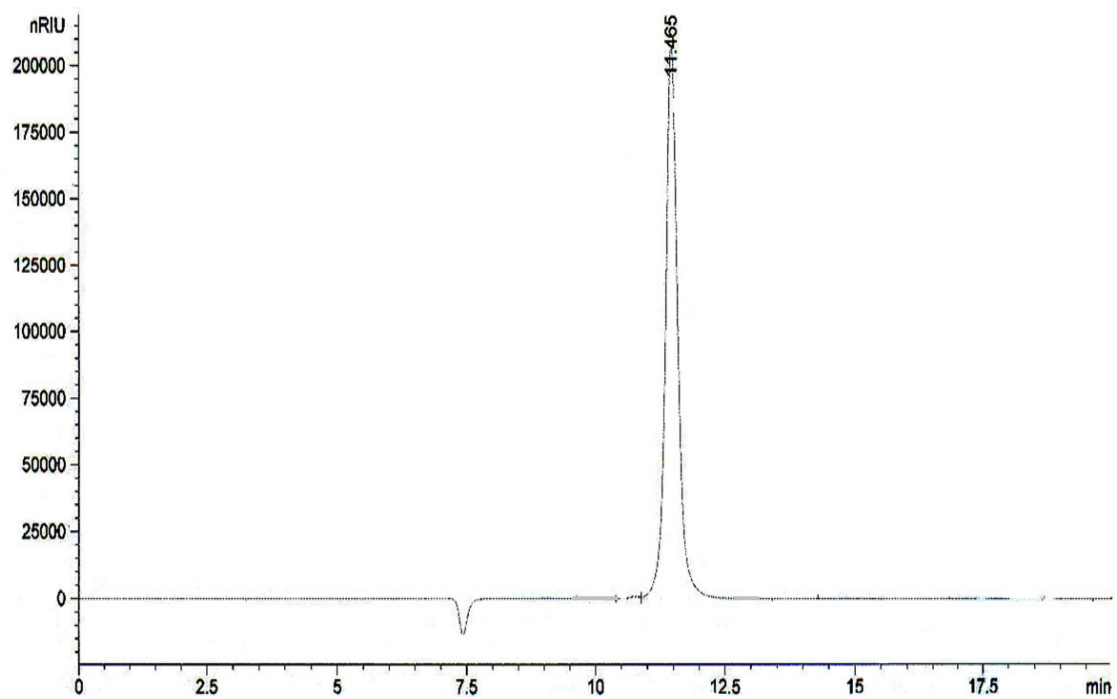


Figure 39. HPLC chromatogram of standard mannose sugar.

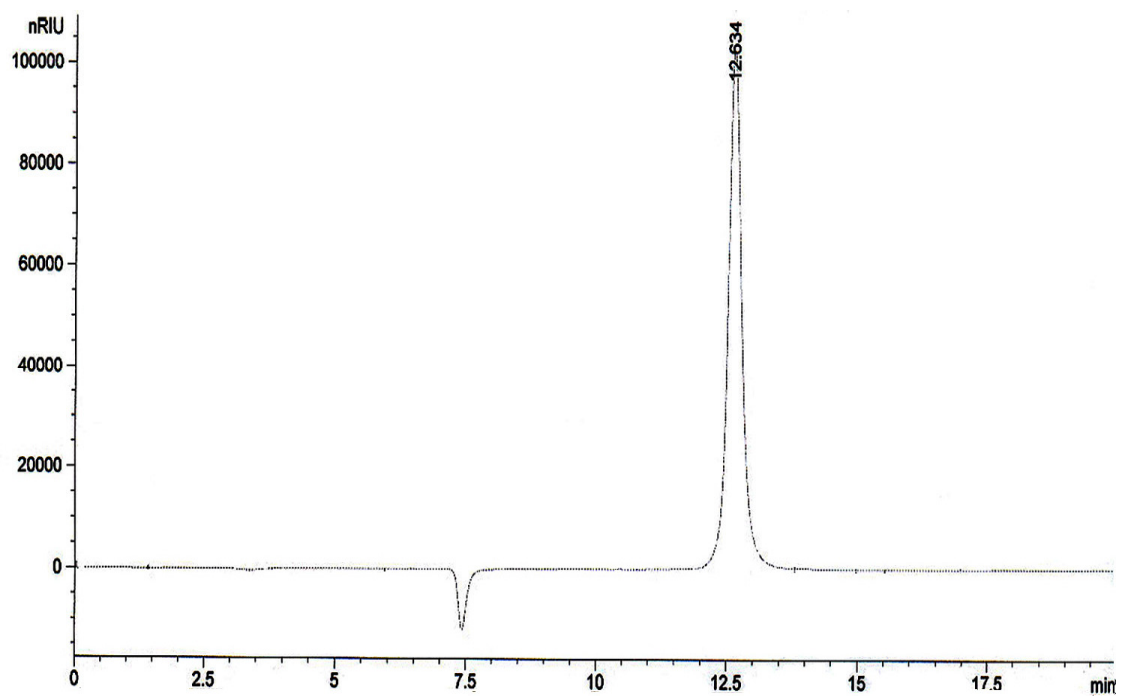


Figure 40. HPLC chromatogram of standard arabinose sugar.

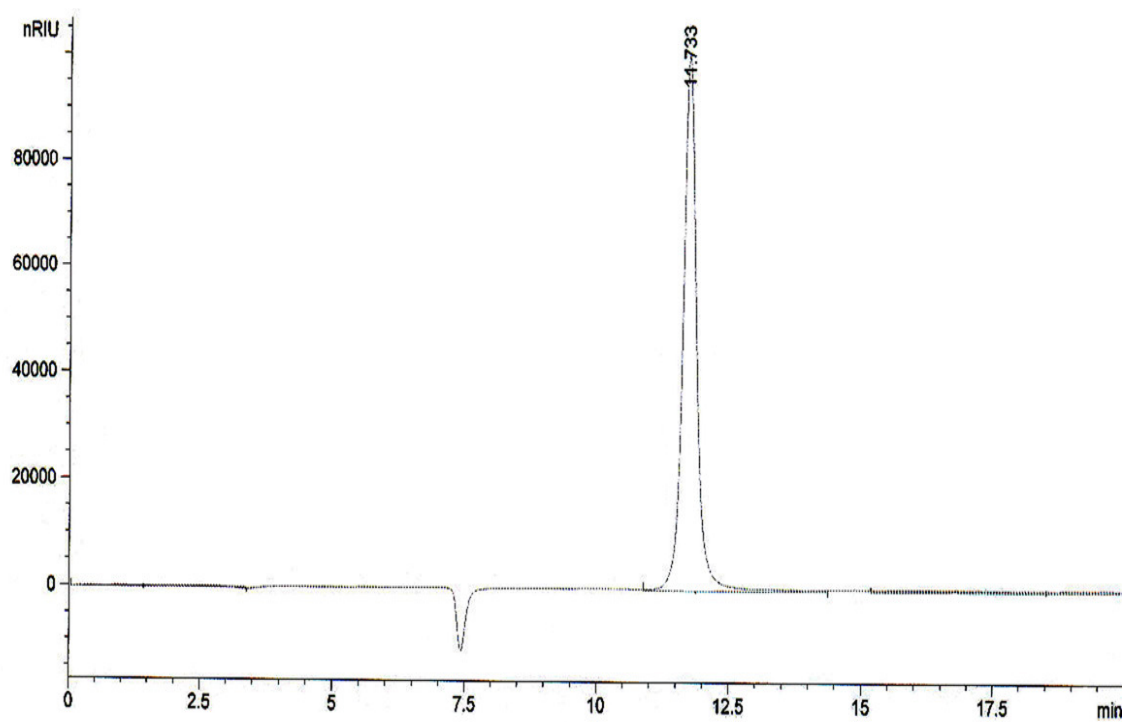


Figure 41. HPLC chromatogram of standard fructose sugar.

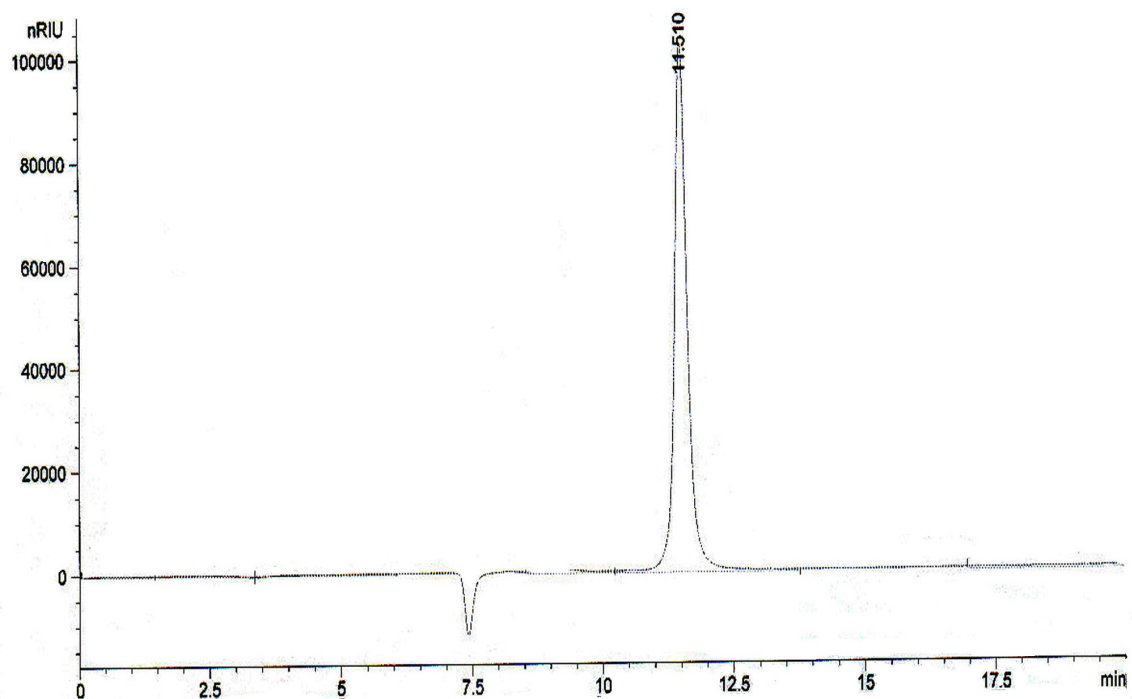


Figure 42. HPLC chromatogram of standard galactose sugar.

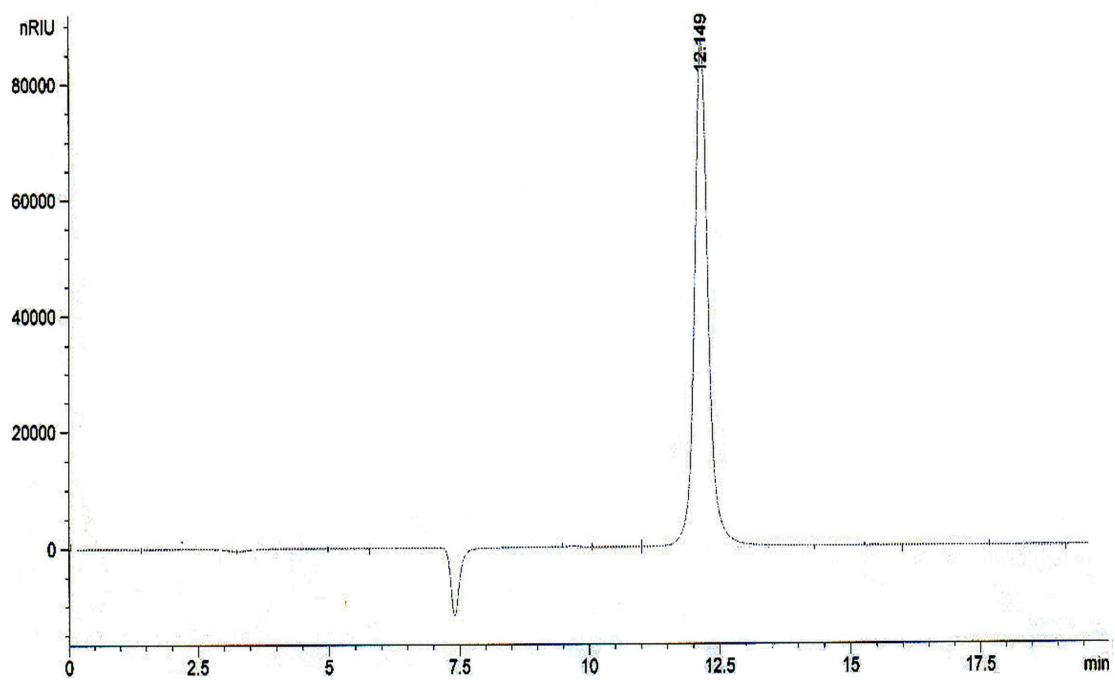


Figure 43. HPLC chromatogram of standard rhamnose sugar.

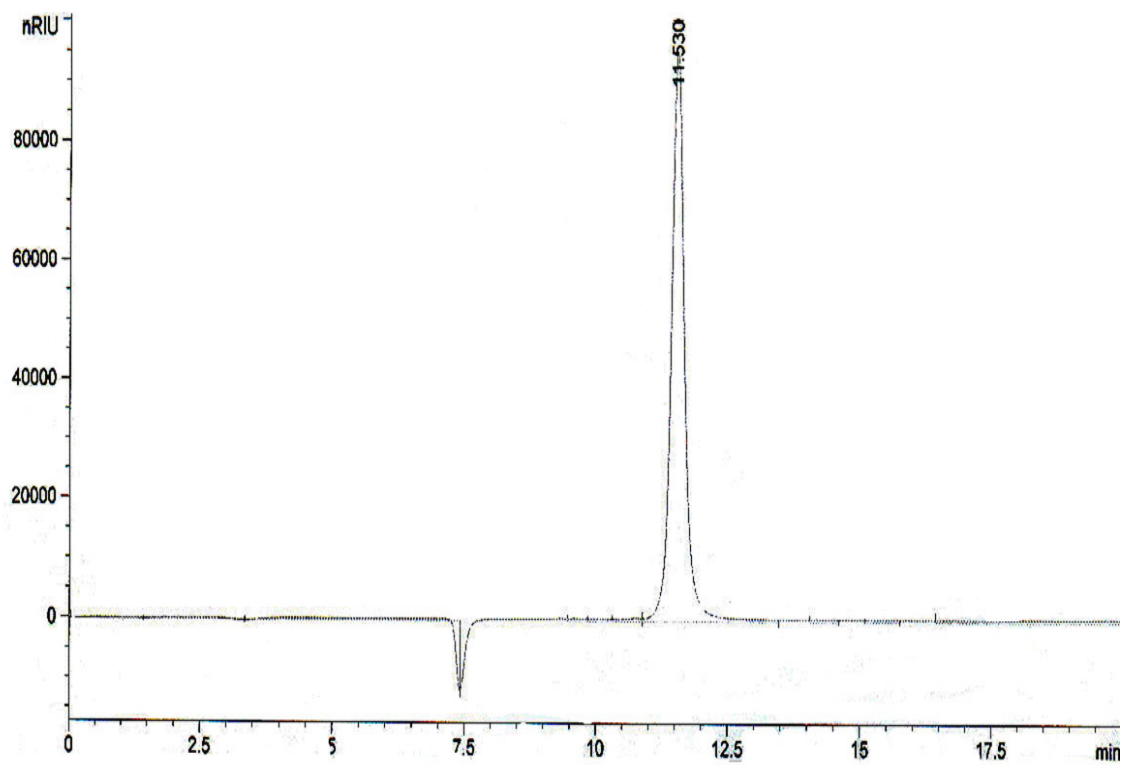


Figure 44. HPLC chromatogram of standard xylose sugar.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวดาวัลย์ ช่วยชาติ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5011020055

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Chuaychart, L., Kajana-Opas, A. and Maneerat, S. 2008. Isolation of Exopolysaccharides Producing Marine Bacteria and their Identification by 16S rDNA Sequence Analysis. Poster presentation at The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. TSB 2008: Biotechnology for Global Care. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. 14th-17th October 2008. pp.183