การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์

Screening of Thermotolerant Polymer-Producing Bacteria, Classification and Properties of the Polymers

ศิริพร หมาดหล้า

Siribhorn Madla

ว
เลขหมู่ QP 801.B69 M64 2544 ฉ.2
Bib Key 211956
12 ก.ค. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ การจำแนกชนิด และคุณสมบัติของพอลิเมอร์
ผู้เขียน	นางสาวศิริพร หมาดหล้า
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ดร. ภาวดี เมธะคานนท์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ดร. ภาวดี เมธะคานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์
ผู้เขียน	นางสาวศิริพร หมาดหล้า
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2543

ขอขอบคุณ คุณหญิงหลง อรรถกระวีกุลชัย
กรรมการมูลนิธิ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ได้รับจาก
มหาวิทยาลัย สค.
วันที่ เลขทะเบียน 12 ก.ค. 2544

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 6 สูตร พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 54 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น จุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพอลิกลูตามิก (PGA) 42 สายพันธุ์ ชนิดพอลิแซคคาไรด์ (PS) และชนิดไกลโคลิปิด (GL) ชนิดละ 4 สายพันธุ์ ชนิดโปรตีน (PR) 3 สายพันธุ์ และชนิดไกลโคโปรตีน (GP) 1 สายพันธุ์ และไม่ปรากฏการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพอลิไลซีน (PL) เมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้ในอาหารสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูงสุดได้ 10 สายพันธุ์ และพบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง เนื่องจากสามารถเจริญและให้ผลผลิตพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ได้ดี จากขั้นตอนนี้เลือกจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ SM 13, SM 29 และ SM 52 ซึ่งให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูงสุด จากการจำแนกชนิดของเชื้อพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ SM 13, SM 29 และ SM 52 สามารถจำแนกได้เป็น *Proteus mirabilis* SM 13 *Bacillus subtilis*. SM 29 และ *Bacillus subtilis* SM 52 ตามลำดับ นำพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Bacillus subtilis* SM 52 ไปผ่านการทำบริสุทธิ์ วิเคราะห์องค์ประกอบ และศึกษาคุณสมบัติบางประการ พบว่าพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ประกอบด้วยหมู่อัลฟาอะมิโนแต่ไม่มีกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 12.9%, 13.3% และ 9.5% ตามลำดับ มีแร่ธาตุแต่ละชนิดในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ มีปริมาณคาร์บอนในช่วง 30.75 - 30.99% ปริมาณไฮโดรเจนในช่วง 4.22 - 5.46% ปริมาณออกซิเจนในช่วง 48.13 - 52.71% และปริมาณไนโตรเจนในช่วง 5.42 - 6.08% ไม่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล มีกรดกลูตามิกในปริมาณสูงที่สุดโดยคิดเป็น 96.92%, 98.26% และ 98.48% ของกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด ตามลำดับ พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอน

โดยใช้สารแขวนลอย kaolin (~ 0.1 - 0.2) และอัตราการตกตะกอน (~ 6.5 - 16.1%) ที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากการใช้น้ำหมักมาก (4.6 - 9.5 และ 74.6 - 94.3% ตามลำดับ) น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Bacillus subtilis* SM 29 เท่ากับ 5.4×10^4, 5.9×10^4 และ 5.8×10^4 ดาลตัน และมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.1, 3.3 และ 2.8 ตามลำดับ เมื่อทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมตแทนการใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า และเมื่อนำพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ไปผ่านการทำบริสุทธิ์ ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติบางประการ ผลการทดลองที่ได้ให้ค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้จากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ เมื่อศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์ พบว่าการใช้อะซิโตนสามารถตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากน้ำหมักได้ในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือ เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ

Thesis Title	Screening of Thermotolerant Polymer-Producing Bacteria, Classification and Properties of the Polymers
Author	Miss. Siribhorn Madla
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2000

Abstract

Six different media for growth of bacteria producing polyglutamic acid (PGA), glycoprotein (GP), polysaccharide (PS), protein (PR), glycolipid (GL), and polylysine (PL), were used for isolation. Fifty-four strains of polymer-producing bacteria were achieved from PGA (42 strains), PS (4 strains), GL (4 strains), PR (3 strains), GP (1 strain) and no growth on PL medium. The isolates were cultivated in the medium at 45 ^{o}C for 48 h using rotary shaker (200 rpm). Ten strains of PGA-producing bacteria were selected due to their high polymer yields. They were found to be thermotolerant strains since they could grow and give high PGA yield both at 30 ^{o}C as well as at 45 ^{o}C. Three strains, SM 13, SM 29 and SM 52, were selected for further studies and identified to be *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis*. SM 29 and *Bacillus subtilis* SM 52 ,respectively. Polymers produced from these strains were purified, analysed for their compositions and studied on some properties. Results indicated that purified polymers from the isolated *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 29 and *Bacillus subtilis* SM 52 contained alpha-amino acids without any aromatic amino acid, the total sugar contents were 12.9%, 13.3% and 9.5%, respectively. They contained similar amount of each element ; 30.75 – 30.99%C, 4.22 – 5.46%H, 48.13 – 52.71%O and 5.42 – 6.08%N without any sulfur. They contained glutamic acid in the amount of 96.92%, 98.26% and 98.48% of total amino acids in the molecule, respectively. The polymers were soluble in water but insoluble in eleven organic solvents tested. Besides, they also possessed the flocculating properties. Their flocculating activities using kaolin suspension (~ 0.1 - 0.2) and the flocculating rates (6.5 - 16.1%), were much lower than those observed using the

crude polymers (4.6 - 9.5 and 74.6 - 94.3%, respectively). Molecular weight of the polymers from the isolates *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 29 and *Bacillus subtilis* SM 52 were found to be 5.4×10^4, 5.9×10^4 and 5.8×10^4 Daltons, with the polydispersity values of 3.1, 3.3 and 2.8, respectively. Besides, they also able to grow well in PGA-medium containing monosodium glutamate and gave higher dried cell yield than those obtained from using PGA-medium containing L-glutamic acid. Purified polymers from *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 29 and *Bacillus subtilis* SM 52 produced from PGA-medium containing monosodium glutamate possessed similar values as those obtained previously using L – glutamic acid. Studies on the effect of solvent on the precipitation of polymer revealed that acetone was able to precipitate polymer from culture broth better ethanol and methanol, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ ดร. ภาวดี เมธะคานนท์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้กำลังใจในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือกลาง เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ประจำคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนการศึกษา คือ ทุนเรียนดี ระหว่างปีการศึกษา 2541-2542 และทุนอุดหนุนในการค้นคว้าวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ตลอดจนพี่ และน้องนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา และขอขอบคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ ที่มีส่วนช่วยทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ท้ายสุดผู้เขียนขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีที่สุดมาโดยตลอด

ศิริพร หมาดหล้า

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(12)
รายการภาพ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
1. จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง	3
2. ประเภทและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพ	6
2.1 พอลิเมอร์ชนิดโปรตีนและไกลโคลิปิด	6
2.2 พอลิเมอร์ชนิดพอลิอะมิโนแอซิด	7
2.2.1 พอลิกลูตามิกแอซิด	7
2.2.2 พอลิไลซีน	10
2.3 พอลิเมอร์ชนิดไลปิด	13
2.4 พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์	13
3. การจำแนกชนิดของพอลิเมอร์	17
3.1 การจำแนกชนิดตามกระบวนการสังเคราะห์	17
3.1.1 พอลิเมอร์ภายในเซลล์	17
3.1.2 พอลิเมอร์ภายนอกเซลล์	17
3.2 การจำแนกชนิดตามลักษณะการสร้างซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างของเซลล์	17
3.2.1 พอลิเมอร์ที่สร้างภายในเซลล์	17
3.2.2 พอลิเมอร์ที่เป็นโครงสร้าง	17

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การจำแนกตามโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ 17

3.3.1 โฮโมพอลิเมอร์ 17

3.3.2 โคพอลิเมอร์ 18

3.4 การจำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิเมอร์ 18

3.4.1 พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุลบ 18

3.4.2 พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง 18

3.4.3 พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุบวก 18

วัตถุประสงค์ 20

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 21

วัสดุ 21

อุปกรณ์ 23

การวิเคราะห์ 23

วิธีการทดลอง 26

1. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ 26

1.1 การแยกเชื้อ 26

1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูง 27

1.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ทนร้อนของจุลินทรีย์ที่แยกได้ 27

1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ 27

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ 27

2.1 การทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์ 27

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ 28

2.3 การหาน้ำหนักโมเลกุล 28

2.4 การวัดค่ากิจกรรมการตกตะกอน 28

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

2.5 คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์ 28

3. การเปรียบเทียบการเจริญและผลผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ 29

3.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน 29

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน 29

3.3 การคัดเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการตกตะกอนพอลิเมอร์ 29

3.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ที่ได้เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์ 29

3. ผลและวิจารณ์ 30

1. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ 30

1.1 การแยกเชื้อ 30

1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูง 34

1.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ทนร้อนของจุลินทรีย์ที่แยกได้ 37

1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ 41

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ 41

2.1 การทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์ 41

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ 41

2.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล 49

2.4 คุณสมบัติในการตกตะกอนของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 53

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

2.5 คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 56

3.เปรียบเทียบการเจริญและผลผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 56

3.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน 56

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน 63

3.3 การคัดเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการตกตะกอนพอลิเมอร์ 65

3.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ที่ได้เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์ 67

4. สรุป 70

ข้อเสนอแนะ 71

เอกสารอ้างอิง 72

ภาคผนวก 79

ผลงานทางวิชาการ 85

ประวัติผู้เขียน 86

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. ช่วงอุณหภูมิของสิ่งมีชีวิตที่ชอบอุณหภูมิสูง	5
2. แบคทีเรียที่ผลิตพอลิอะมิโนแอซิด	12
3. องค์ประกอบชนิดอื่นที่พบในพอลิแซคคาไรด์นอกเหนือจากสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรท	14
4. การประยุกต์ใช้พอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์	16
5. องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทเฮทเทอโรพอลิเมอร์	19
6. จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ	32
7. จำนวนจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	33
8. ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ที่แยกได้บนอาหารแต่ละชนิดที่ใช้ในการแยกเชื้อ	35
9. ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จำนวน 54 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ที่ความเร็ว รอบ 200 รอบต่อนาที	38
10. ผลผลิตพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อเจริญในอาหารสูตร PGA ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	40
11. การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกโดยใช้วิธีทางชีวเคมี	42
12. องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	46
13. ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์ในพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	48
14. ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	50
15. น้ำหนักโมเลกุล และการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำ	51

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
16. คุณสมบัติในการตกตะกอนของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการใช้น้ำหมัก (เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง)	54
17. คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	57
18. ผลผลิตพอลิเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	59
19. คุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการใช้กรดกลูตามิกทางการค้า เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	64
20. ผลผลิตพอลิเมอร์ที่ได้จากการตกตะกอนโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	66
21. คุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอน เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	68

รายการภาพ

ภาพ	หน้า
1. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย แสดงขอบเขตอุณหภูมิของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophile boundary) และแสดงการแบ่งชนิดของแบคทีเรียตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ	4
2. วิถีการสังเคราะห์ PGA ใน *Bacillus subtilis* IFO 3335	9
3. ลักษณะของจุลินทรีย์ที่แยกได้เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	31
4. ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* WD 90	43
5. ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* KF 4.1	44
6. ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* FT 1.2	45
7. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอชของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* WD 90 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	60
8. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอชของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* KF 4.1 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	61
9. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอชของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* FT 1.2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	62
10. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	81
11. กราฟมาตรฐานพอลลูแลน	82

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตพอลิเมอร์ที่มีลักษณะข้นหนืด และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ (Margaritis and Pace, 1985) เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และ รา (Takagi and Kadowagi, 1985) พอลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันได้เป็น พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ พอลิเมอร์ชนิดพอลิอะมิโนแอซิด พอลิเมอร์ชนิดไกลโคโปรตีน พอลิเมอร์ชนิดไกลโคลิปิด และพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน พอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักกันดีและปัจจุบันมีการนำมาประยุกต์ใช้และยอมรับเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพ คือ พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตทางการค้า และมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ในขณะที่พอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ ยังอยู่ในขั้นตอนของการพัฒนาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต (Sutherland, 1998) ซึ่งพอลิเมอร์แต่ละชนิดสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากพอลิเมอร์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ได้ก่อนการศึกษาในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้ ปัจจุบันนี้มีการศึกษาถึงแนวทางในการนำพอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (bioflocculant) สารดูดซับน้ำทางชีวภาพ (bioabsorbent) สารดูดซับโลหะหนัก (heavy metal biosorbent) สารไฮโดรเจล (hydrogel) และการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์เป็นสารตัวนำพายา (drug carrier)

การใช้พอลิเมอร์ชีวภาพยังไม่เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีราคาแพงและประสิทธิภาพในการใช้งานไม่เท่ากับการใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ อย่างไรก็ตามการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพมีข้อดีกว่าการใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีอะคริลาไมด์ (acrylamide) เป็นหน่วยย่อยเป็นสารตกตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งอะคริลาไมด์ (acrylamide) เป็นสารก่อมะเร็ง

เป็นพิษต่อระบบประสาท สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานานอีกด้วย (Yokoi *et al.*, 1995) ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพให้มีประสิทธิภาพในการ ใช้งานให้ทัดเทียมกับการใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์จึงเป็นแนวทางการศึกษาที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

พอลิเมอร์ที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้เป็นพอลิเมอร์ชนิดที่หลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular polymer) เนื่องจากง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ แต่ปัญหาที่มักพบในการผลิตพอลิเมอร์ คือ ความหนืดของน้ำหมักที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดปัญหาในการกวนและการให้อากาศ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ และศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ เพื่อเป็นการค้นพบจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่สามารถผลิตพอลิเมอร์และลดปัญหาในเรื่องความหนืดของน้ำหมักที่เพิ่มขึ้นด้วย

ตรวจเอกสาร

1. จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง

จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (Aragno, 1992) แต่ Henis (1987) ได้ให้ความหมายที่แตกต่างเล็กน้อย โดยระบุว่า แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง คือ แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ได้ดีเช่นเดียวกัน ภาพที่ 1 แสดงการแบ่งช่วงอุณหภูมิที่สัมพันธ์กับการเจริญในแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงโดยใช้อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียสเป็นจุดแบ่ง เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส สามารถพบสิ่งมีชีวิตได้หลากหลายชนิด และที่อุณหภูมิมากกว่า 55 - 60 องศาเซลเซียส จะพบสิ่งมีชีวิตได้น้อย นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จะไม่พบสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอตเลย พบเฉพาะโปรคาริโอตเท่านั้น จึงใช้อุณหภูมิช่วง 50 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเส้นแบ่ง (Brock, 1986)

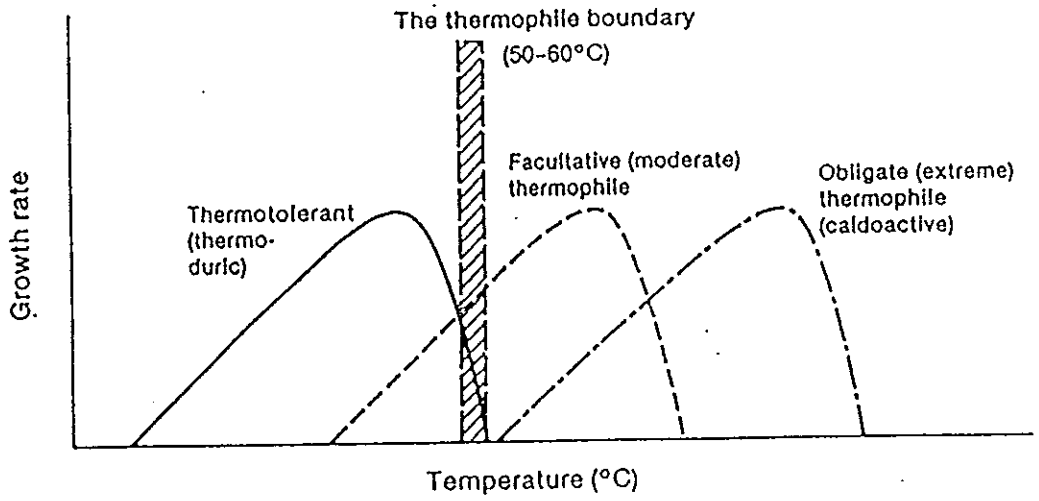
Miehe (1970 อ้างโดย Wiegel and Ljungdahl, 1984) ได้พยายามแบ่งกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic organisms) โดยอาศัยเกณฑ์การแบ่งตามช่วงอุณหภูมิสามช่วง คือ T_{max} คือ อุณหภูมิสูงสุดที่สิ่งมีชีวิตสามารถเจริญได้, T_{opt} คือ อุณหภูมิที่สิ่งมีชีวิตใช้เวลาน้อยที่สุดในการเพิ่มจำนวนมวลชีวภาพ และ T_{min} คือ อุณหภูมิต่ำสุดที่สิ่งมีชีวิตสามารถเพิ่มจำนวนได้ในอัตราที่เหมาะสม โดยสามารถแบ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้เป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ข้อดีและข้อด้อยของการใช้จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงในระดับอุตสาหกรรม

Brock และ Modigan (1991) ได้กล่าวไว้ว่าการนำจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีทั้งข้อดีและข้อด้อย ดังนี้ คือ

ข้อดี

1. จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จากการที่สารประกอบที่ไม่ใช่ก๊าซมีอัตราการแพร่และการละลายเพิ่มขึ้น รวมทั้งอุณหภูมิที่สูงยังช่วยลดความหนืดและลดแรงตึงผิวของน้ำซึ่งมีผลในทางบวกต่อปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย แสดงขอบเขตอุณหภูมิของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophile boundary) และแสดงการแบ่งชนิดของแบคทีเรียตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ที่มา : Brock (1986)

ตารางที่ 1 : คำจำกัดความของสิ่งมีชีวิตที่ชอบอุณหภูมิสูง

Organisms	T_{min}	T_{opt}	T_{max}
Thermotolerant	-	≤ 45	> 45
Temperature-torerant thermophiles	< 25	> 45	> 50
Thermophiles	> 25	> 45	> 50
Temperature-tolerant extreme thermophiles	≥ 35	≥ 65	≥ 70
Extreme thermophiles (caldoactive)	≥ 50	≥ 65	≥ 70
Barothermotolerants	-	< 100	> 100
Barothermophiles	-	> 100	> 100

ที่มา : Wiegel และ Ljungdahl (1984)

2. จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จากการที่สารประกอบที่ไม่ใช่ก๊าซมีอัตราการแพร่และการละลายเพิ่มขึ้น รวมทั้งอุณหภูมิที่สูงยังมีส่วนช่วยลดความหนืดและลดแรงตึงผิวของน้ำซึ่งมีผลในทางบวกต่อปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์
3. ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดความเสียหายส่วนมากเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophile)
4. ช่วยประหยัดพลังงาน ได้แก่
   4.1 ลดค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับระบบทำความเย็น เนื่องจากมีความร้อนเกิดขึ้นจากกิจกรรมของกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องมีระบบทำความเย็นเข้ามาช่วยในการลดระดับของอุณหภูมิลง ซึ่งค่าใช้จ่ายในส่วนนี้มีผลอย่างมากต่อค่าใช้จ่ายรวมในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม หากใช้กระบวนการผลิตที่อุณหภูมิต่ำ แต่ถ้าหันมาใช้จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง จะช่วยลดปัญหาในจุดนี้ลงได้มาก
   4.2 ลดพลังงานที่ใช้ในการกวน เนื่องจากความหนืดของน้ำหมักลดลง

5. กรณีการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง พบว่าเอนไซม์จะมีความเสถียร (stable) มากกว่าและมีอายุการเก็บ (shelf life) นานกว่าการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง

ข้อด้อย

1. การใช้จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงต้องใช้พลังงานสูงในการให้ความร้อน เนื่องจากความร้อนที่เกิดจากตัวจุลินทรีย์เองจากกิจกรรมของกระบวนการเมทาบอลิซึมไม่เพียงพอ
2. ยากต่อการรักษาระบบให้คงที่ ถ้าหากต้องเดินระบบเป็นเวลานาน ๆ
3. ของเสียที่เป็นของเหลวที่ออกจากระบบ บางตัวอย่างมีคุณภาพต่ำ

2. ประเภทและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพ

พอลิเมอร์ชีวภาพ คือ พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย, แอคติโนมัยซีส และ รา โดยใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์แบบควบแน่น (condensation) ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยาจะทำให้โมเลกุลเล็ก ๆ ที่มีอยู่ในโครงสร้างของโมโนเมอร์ เช่น H_2O, HCl และ CH_3OH ขาดหายไปเมื่อเปรียบเทียบหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันในโครงสร้างของพอลิเมอร์กับโมโนเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิดนั้น (ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2526) ในการเชื่อมต่อหน่วยย่อยหรือโมโนเมอร์เข้าด้วยกัน

พอลิเมอร์ชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ตามองค์ประกอบของพอลิเมอร์ ได้แก่

2.1 พอลิเมอร์ชนิดโปรตีนและไกลโคลิปิด (Protein and glycolipid polymer)

พอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตโดย *Rhodococcus erythropolis* S-1 มีชื่อเรียกว่า NOC-1 มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 11 (โดยน้ำหนัก) (Takeda, *et al.*, 1991) แสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ สามารถตกตะกอนได้ทั้ง สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ (Kurane, *et al.*, 1986) เมื่อศึกษาถึงกลไกการตกตะกอน พบว่าการตกตะกอนเกิดจากการจับตัวเป็นไมเซลล์ที่เกิดจากสายเปปไทด์ หลาย ๆ สายมารวมกันของ พอลิเมอร์ เปปไทด์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการตกตะกอนของพอลิเมอร์ โดยกิจกรรมการตกตะกอนจะไม่เกิดขึ้นถ้าหากว่ามีการบ่มพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสก่อนนำมาใช้

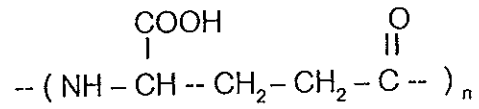
การผลิตพอลิเมอร์โดย *Rhodococcus erythropolis* S-1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันจะผลิตพอลิเมอร์ในรูปแบบที่ต่างกันด้วย โดยพบว่าเมื่อเชื้อเติบโตโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ พอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้จะหลั่งออกสู่สิ่งแวดล้อม แต่เมื่อเชื้อเติบโตในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นไฮโดรคาร์บอน เช่น *n*-pentadecane พอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้จะติดอยู่กับตัวเซลล์ ซึ่งยากต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (Takeda, *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่า *R. erythropolis* S-1 ใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยสามารถเติบโตและให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ที่ไม่แตกต่างกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ 1.3 หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน) แอลกอฮอล์จึงเป็นแหล่งคาร์บอนใหม่ที่น่าสนใจในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ เนื่องจากทำให้ลดต้นทุนในการผลิต จึงอาจมีแนวโน้มในการนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบมาใช้สำหรับการผลิตพอลิเมอร์ต่อไปในอนาคต (Kurane, *et al.*, 1994)

พอลิเมอร์ชนิดโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่ง คือ ไกลโคโปรตีน มีน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Arcuadendron sp.* TS-49 เมื่อศึกษาถึงองค์ประกอบของพอลิเมอร์ พบว่าประกอบด้วย เฮกโซซามีน กรดยูโรนิก น้ำตาลที่เป็นกลาง และโปรตีนในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง โดยพอลิเมอร์ที่ผลิตได้สามารถแสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพซึ่งสามารถตกตะกอนได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (Lee, *et al,*. 1995)

จากคุณสมบัติที่สำคัญของพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ ที่สามารถใช้เป็นสารตกตะกอนได้ จึงมีแนวโน้มที่จะนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการหมักในขั้นตอนของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ การทำน้ำประปา และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น (Kurane, *et al.*, 1986)

2.2 พอลิเมอร์ชนิดพอลิอะมิโนแอซิด (Poly (amino acid) polymer)

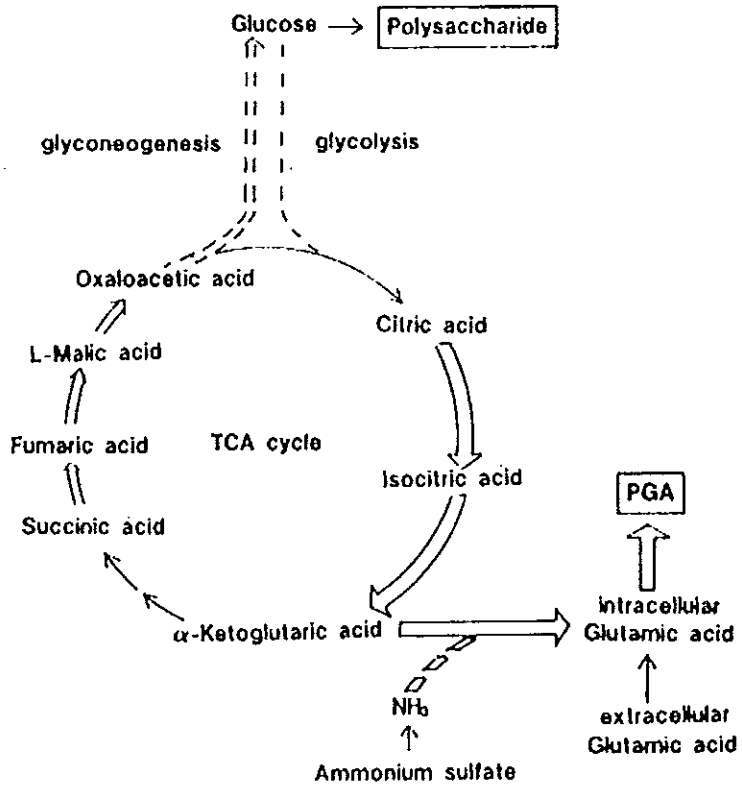
2.2.1 พอลิกลูตามิกแอซิด (poly (γ- glutamic acid)) หรือ PGA เป็นพอลิอะมิโนแอซิดชนิดหนึ่ง เกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่าง α-amino group และ γ-carboxyl group ในโมเลกุลของกรดกลูตามิก (Kunioka, 1997) โดยมีโครงสร้างโมเลกุลดังนี้ (Goto and Kunioka, 1992)



PGA สามารถแยกหรือสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ไซยาโน-แบคทีเรีย (cyanobacteria) และเมล็ดพืช พบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Bacillus* ผลิต PGA ในรูปของแคปซูลหรือเป็นสารข้นหนืดที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (Kubota, *et al.*, 1993) เช่น *B. subtilis, B. licheniformis* และ *B. anthracis* (Yokoi, *et al.*, 1995) แบคทีเรียที่ผลิต PGA สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียที่ผลิต PGA เมื่อมีการเติมกรดกลูตามิกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *B. subtilis, B. subtilis* ATCC 9945, *B. subtilis* IFO 3335 และ *B. subtilis* F-2-01 ส่วนแบคทีเรียอีกกลุ่มคือ แบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *B. subtilis* 5E และ *B. licheniformis* A 35 (Ito, *et al.*, 1996)

PGA เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดความเหนียว หนืด ในถั่วเน่า (natto) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวญี่ปุ่น ได้จากการหมักถั่วเหลืองกับเชื้อ *B. subtilis* (natto) มีการพบว่าสารดังกล่าวที่ทำให้เกิดความเหนียว และหนืด ประกอบด้วย ฟรัคแทนในรูปลีแวน (levan-form fructan) และพอลิกลูตามิกแอซิด (PGA) เป็นสำคัญ (Hara and Ueda, 1982)

เพื่อให้เข้าใจถึงกระบวนการสังเคราะห์ PGA และเพื่อเพิ่มผลผลิตของ PGA Goto และ Kunioka (1992) ศึกษากระบวนการสังเคราะห์ PGA ใน *B. subtilis* IFO 3335 พบว่า กรดซิตริก และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์ PGA โดยเมื่อเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ PGA ที่ผลิตได้จะเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้ามีการเติมกรดมาลิก กรดฟูมาริก หรือกรดซัคซินิก ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงโดยผ่านกระบวนการ gluconeogenesis (ภาพที่ 2)



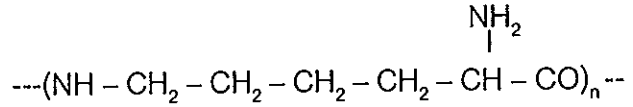
ภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์ PGA ใน *Bacillus subtilis* IFO 3335
ที่มา : Goto and Kunioka (1992)

คุณสมบัติที่สำคัญของ PGA คือ เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่ที่ละลายน้ำได้ ภายในโมเลกุลประกอบด้วย D-glutamic acid และ L-glutamic acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน (Ito, *et al.*, 1996) สามารถย่อยสลายได้โดยวิธีทางชีวภาพ (biodegradable) กินได้ (eatable) ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการบำบัดน้ำเสียการผลิตน้ำดื่ม และกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมการหมัก (Yokoi, *et al.*, 1996) ใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียว (thickener) สารรักษาความชื้น (humectants) และการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยใช้เป็นสารตัวนำพายา (drug carrier) (Goto and Kunioka, 1992) ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นสารตัวนำพา

ยาได้ คือ สามารถละลายได้ดีในน้ำ ย่อยสลายได้โดยวิธีการทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษ ไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (non-immunogenic) และเชื่อมต่อกับตัวยาที่ต้องการใช้ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้อนุพันธ์ของ PGA ในการนำไปใช้เป็นสารตัวนำพายา โดยทดลองในหนูเพศเมีย พบว่าการใช้สารดังกล่าวสามารถยืดอายุเวลาของยาที่อยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น และยาจะค่อย ๆ ดูดซึมอย่างช้า ๆ (Hoste, *et al.*, 2000)

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อดัดแปลงโครงสร้างของ PGA ทำให้ PGA มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น การใช้ปฏิกิริยาเอสเทริฟิเคชั่น (esterification) ตรงบริเวณหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของ PGA ทำให้ esterified PGA ที่ได้แสดงคุณสมบัติเป็นพลาสติกทนร้อน (thermoplastic) นอกจากนี้ยังพบว่า PGA สามารถเกิดเป็นไฮโดรเจล (hydrogel) ได้โดยใช้รังสีแกมมา (γ - irradiation) ไฮโดรเจลที่ได้สามารถดูดซับน้ำได้สูงถึง 200 - 3,500 เท่าของน้ำหนักตัว ซึ่งเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ที่น่าสนใจในอนาคต เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางธรรมชาติ และสามารถกลับเข้าสู่วัฏจักรคาร์บอนในธรรมชาติได้ จึงไม่ทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Kunioka, 1997)

2.2.2 ε-polylysine (epsilon-polylysine) หรือ PL เป็นพอลิอะมิโนแอซิดชนิดหนึ่ง ซึ่งพบในจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีส โดยพบใน *Streptomyces albulus* ที่แยกได้จากดิน PL เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่าง แอล-ไลซีน (L-lysine) ประมาณ 25-30 โมเลกุล (Shima and Sakai, 1981a) โดยเชื่อมต่อกันระหว่าง α-carboxyl group กับ ε-amino group แสดงได้ดังนี้ (Kunioka, 1997)



PL สามารถละลายได้ในน้ำ ย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000 ดาลตัน (Shima and Sakai, 1981b) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อใช้ใน

ระดับความเข้มข้น 1 - 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่ากิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์เมื่อใช้ microbial PL ให้ผลดีกว่าการใช้ PL ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมี (chemical synthesized α-poly (lysine) (n=50)) (Shima, *et al.*, 1982; อ้างโดย Kunioka, 1997) นอกจากนี้ PL ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ประมาณ 25-30 โมเลกุล (n= 25-30) ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ bacteriophage โดยพบว่าคุณสมบัติการเป็น antiphage ของ PL จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ phage ซึ่งพบว่า PL สามารถยับยั้ง phage ที่มีโครงสร้างเป็นแบบ long-tail, non-contractile ได้ดี (Shima, *et al.*, 1982) นอกจากนี้ PL ยังสามารถเกิดเป็นไฮโดรเจลได้โดยการใช้รังสีแกมมาในระดับ 1.6 กิโลเกรย์ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน (Kunioka and Choi; 1995 อ้างโดย Kunioka, 1997) และเมื่อใช้ความแรงรังสีเท่ากับ 75 กิโลเกรย์ ฉายลงไปในสารละลาย PL ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ไฮโดรเจลของพอลิไลซีนที่ได้จะมีความสามารถในการดูดซับน้ำประมาณ 160 เท่าของน้ำหนักตัว ไฮโดรเจลที่เกิดขึ้นสามารถย่อยสลายได้เมื่อมีการให้ความร้อน และถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จึงมีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านสิ่งแวดล้อม หรือใช้กับมนุษย์ (Kunioka, 1997)

จากการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PL จาก *Streptomyces albulus* พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25 - 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.0 และการเติมโพรลีน (proline) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อสามารถผลิต PL ได้เพิ่มขึ้น (2.83 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่การเติมไลซีน (L-lysine) เพียงอย่างเดียวเชื้อจะผลิต PL ได้ในปริมาณที่น้อยกว่า (0.33 กรัมต่อลิตร) (Shima and Sakai, 1981a)

ปัจจุบันพบจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตพอลิอะมิโนแอซิดได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการสารอาหาร สภาวะในการเจริญ และให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่ผลิตพอลิอะมิโนแอซิด

Strains	Nutritional requirements		Culivation	Product amounts
	Constituent	c (g/l)		(g/l)
Poly (γ-glutamic acid)				
Bacillus licheniformis ATCC 9945	glutamic acid,	20	37 °C	17 – 23
	glycerol,	80	4 days	
	citric acid,	12		
	NH_4Cl	7		
Bacilllus subtilis NRRL B2612	wheat gluten	200	33 °C	10 - 14
			2 –3 days	
Bacilllus subtilis F02 – 1	glutamic acid,	70	37 °C	45.5
	glucose,	1	2 – 3 days	
	veal infusion broth	20		
Bacilllus subtilis IFO 3335	glutamic acid,	30	37 °C	10 – 20
	citric acid,	20	2 days	
	$(NH_4)_2SO_4$	5		
Bacilllus subtilis var *polyglutamicum*	glucose,	50	30 °C	17 - 19
	urea	7.5	3 – 4 days	
Bacillus licheniformis A 35	glucose,	75	30 °C	8 – 12
	NH_4Cl	18	3 – 5 days	
Bacilllus subtilis TAM – 4	fructose,	75	30 °C	20
	NH_4Cl	18	4 days	
ε - Polylysine				
Streptomyces albulus No. 346	glucose,	20	30 °C	4-5
	citric acid,	20	8-9 days	
	$(NH_4)_2SO_4$	10	two-step	
			Cultivation	

ที่มา : Kunioka (1997)

2.3 พอลิเมอร์ชนิดไลปิด (Lipid polymer)

Rhodococcus erythropolis S-1 สามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน ซึ่งมีชื่อเรียกว่า NOC-1 (Takeda, *et al.*, 1991) และจากการศึกษาเพิ่มเติมโดย Kurane และคณะ (1994) พบว่า *R. erythropolis* S-1 ยังสามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดไลปิด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพได้เช่นเดียวกัน พอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุลมากกว่า 1 ล้านดาลตัน ประกอบด้วยส่วนของพอลิเปปไทด์ (น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10 – 100 กิโลดาลตัน) และไลปิดเป็นจำนวนมาก เมื่อทำการศึกษาถึงส่วนที่เป็นไลปิด พบว่าไลปิดที่สกัดได้เป็นจำพวกไกลโคไลปิด ภายในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่มีขั้ว (สายยาวของ methylene group) และส่วนที่มีขั้ว (ส่วนของน้ำตาลกลูโคส) จึงทำให้พอลิเมอร์ชนิดไลปิดสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น คลอโรฟอร์ม

2.4 พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide polymer)

พอลิแซคคาไรด์จัดเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งเกิดจากการที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กรดยูโรนิก หรือน้ำตาลอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Whistler, 1969)

Sutherland (1990) ได้จำแนกชนิดของพอลิแซคคาไรด์ตามองค์ประกอบภายในโมเลกุลออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1) พอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ สารอินทรีย์ที่พบในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ ได้แก่ อะซิเตท ไพรูเวท ซักซิเนต โพรพิโอเนท ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จะมีผลต่อประจุรวม (overall charge) บนโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ นอกจากสารดังกล่าวแล้วยังพบกรดอะมิโน ได้แก่ ซีรีน และกรดกลูตามิก ในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดอีกด้วย

2) พอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์ ฟอสเฟตเป็นสารอนินทรีย์ที่พบได้บ่อยในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งจะเหมือนกับกรดเทโคอิก (teichoic aicd) โดยจะอยู่ในรูปของ phosphorylated exopolysaccharide พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากจะพบฟอสเฟตในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์แล้ว ยังพบว่าพอลิแซคคาไรด์บางชนิดมี

ซัลเฟตอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลด้วย สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่พบได้บ่อยในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบชนิดอื่นที่พบในพอลิแซคคาไรด์นอกเหนือจากสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรท

Substituent	Linkage	EPS-producing bacterium
Organic acids		
Acetate	Ester	Very common
Glycerate	Ester	*Pseudomonas elodea*
Hydroxybutanoate	Ester	*Rhizobium trifolii*
		R. leguminosarum
Propionate	Ester	*Escherichia coli*
Pyruvate	Ketal	Very common
Succinate	Ester	*Rhizobium spp.*
		Agrobacterium spp.
Amino acids		
L-glutamate		*Klebsiella aerogenes* K 82
Serine		*Escherichia coli* K 40
Inorganic acids		
Phosphate		common
Sulphate		cyanobacteria

ที่มา : Sutherland (1990)

3) โฮโมพอลิแซคคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวในโครงสร้าง เช่น กลูแคน ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก จากการที่น้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่ต่างกันจึงทำให้สามารถแบ่งกลูแคนได้หลายชนิด ได้แก่ bacterial cellulose (β-D-

glucan), pullulan (α-D-glucan), curdlan ((1,3)-β-D-glucan from bacteria), scleroglucan ((1,3)-β-D-glucan from fungi) (Sutherland, 1998)

4) เฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ พอลิแซคคาไรด์โดยมากที่พบจัดอยู่ในกลุ่มนี้อาจจะพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป แต่ในบางชนิดอาจพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ต่างกันถึง 5 ชนิด ซึ่งจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้ทำให้คุณสมบัติของพอลิแซคคาไรด์แตกต่างกันออกไป เนื่องจากพันธะและโครงสร้าง (configurations) ของโมเลกุลแตกต่างกัน และบางครั้งอาจพบว่ามี acyl substituents ในโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ด้วย

การนำพอลิแซคคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของพอลิแซคคาไรด์เป็นสำคัญ (ตารางที่ 4) ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Alcaligenes latus* B-16 มีคุณสมบัติเป็นสารดูดซับน้ำทางชีวภาพ (bioabsorbent) โดยสามารถดูดซับน้ำได้สูงถึง 1,000 เท่าของน้ำหนักตัว (Kurane and Nohata, 1994) โดยสารดูดซับน้ำทางชีวภาพตัวนี้มีชื่อเรียกว่า "soyeux eau" มีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำสูงกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ทางการค้าถึง 5 เท่า (Nohata and Kurane, 1994) และสามารถดูดซับน้ำทั้งในน้ำบริสุทธิ์และในสารละลายเกลือ (Kurane and Mita, 1996) จึงเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้ที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากปัจจุบันนิยมใช้ผ้าอ้อมสำเร็จรูปอย่างแพร่หลาย ซึ่งสารที่ใช้ในการผลิตผ้าอ้อมสำเร็จรูปส่วนมากคือ พอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้แก่ polyacrylate และ polyacrylamide โมโนเมอร์ของสารทั้งสองชนิดนี้คือ acrylic acid ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง ส่วน acrylamide เป็นสารที่มีพิษต่อระบบประสาท และเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์แล้ว สารเหล่านี้ยังตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานอีกด้วย นอกจากนี้แนวทางการนำเอาสารดูดซับน้ำทางชีวภาพไปใช้ที่น่าสนใจอีกด้านหนึ่ง คือ การนำไปใช้เป็นสารดูดซับน้ำสำหรับการปลูกพืชในพื้นที่ที่แห้งแล้ง เช่น ทะเลทราย ซึ่งเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้ที่น่าสนใจอีกทางหนึ่งเช่นกัน (Kurane and Nohata, 1994)

ตารางที่ 4 การประยุกต์ใช้พอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์

	Use	Polymer
Biological properties :	Antitumour agents	β-D-glucan
	Eye and joint surgery	Hyaluronic acid
	Heparin analogues	*Escherichia coli*
	Wound dressings	Bacterial cellulose
Chemical properties :	Enzyme substrates	*Escherichia coli*
	Oligosaccharide preparation	Curdlan, pullulan
Physical properties :		
Emulsion stabilization	Food, thixotropic paints	Xanthan
Fibre 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
	Foods	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
Shear thinning and viscosity Control	Oil-drilling 'muds'	Xanthan
Suspending agent	Food	Xanthan
	Paper coatings	Various
	Agrochemical pesticides and sprays	Xanthan
Viscosity control	Jet printing	Xanthan

ที่มา : Sutherland (1998)

3. การจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ พอลิเมอร์สามารถจำแนกออกเป็นประเภทต่าง ๆ ตามเกณฑ์การแบ่งที่ต่างกันดังนี้

3.1 การจำแนกตามกระบวนการสังเคราะห์ สามารถจำแนกพอลิเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (Takagi and Kadowagi, 1985 อ้างโดย Dermlim, 1999)

3.1.1 พอลิเมอร์ภายในเซลล์ (intracellular polymer) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ และต้องอาศัยการสกัด และการทำบริสุทธิ์เพื่อนำเอาพอลิเมอร์ที่ต้องการออกมาจากเซลล์ ตัวอย่างของพอลิเมอร์กลุ่มนี้ ได้แก่ ดีเอ็นเอ (DNA) โปรตีน เอนไซม์ และ เซลลูโลส เป็นต้น

3.1.2 พอลิเมอร์ภายนอกเซลล์ (extracellular polymer) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์และจุลินทรีย์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ใน 2 รูปแบบ คือ แคปซูล ซึ่งยึดติดอยู่กับผนังเซลล์ และในรูปของเมือก (soluble slime) ซึ่งปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบ ๆ เซลล์ ตัวอย่างของพอลิเมอร์กลุ่มนี้ ได้แก่ โปรตีน เอนไซม์ ไกลโคโปรตีน พอลิกลูตาเมต พอลิแซคคาไรด์ และไกลโคลิปิด เป็นต้น

3.2 การจำแนกตามลักษณะการสร้างซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างของเซลล์ McNeely และ Kang (1973 อ้างโดย วีรพันธ์ เดิมหลิ่ม และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) จำแนกตามลักษณะการสร้างเป็น 3 ประเภท ได้แก่

3.2.1 พอลิเมอร์ที่สร้างภายในเซลล์ เช่น แป้งใน *Clostridium sp.* ไกลโคเจนในพวก *Enterobacteriaceae*

3.2.2 พอลิเมอร์ที่เป็นโครงสร้าง เช่น ไลปิดที่พบในรูปของไลโพพอลิแซคคาไรด์ และกรดไทโคอิก (teichoic acid) หรือไคโตแซนที่พบในผนังเซลล์ของรา เป็นต้น

3.3 การจำแนกตามโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ถ้าพิจารณาจากชนิดของหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันในโซ่พอลิเมอร์ สามารถจำแนกพอลิเมอร์ออกเป็น 2 ประเภท คือ (ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2526)

3.3.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) คือ พอลิเมอร์ซึ่งในโซ่พอลิเมอร์มีหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ได้แก่ เบต้ากลูแคน (β - D – glucan เช่น เซลลูโลส เคิร์ดแลน และสเคลอโรกลูแคน) แอลฟากลูแคน (α - D – glucan เช่น เด็กซ์แตรน และพอลลูแลน) (Sutherland, 1990) พอลิกลูตามิกแอซิด (PGA) และพอลิไลซีน (PL) เป็นต้น (Kunioka, 1997)

3.3.2 โคพอลิเมอร์ หรือเฮทเทอโรพอลิเมอร์ (copolymer หรือ heteropolymer) คือ พอลิเมอร์ซึ่งในโซ่พอลิเมอร์มีหน่วยที่ซ้ำ ๆ กัน 2 ชนิดหรือมากกว่า 2 ชนิด ได้แก่ เฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ต่างชนิดกัน เช่น แบคทีเรียล อัลจิเนต (bacterial alginates) อิมัลแซน (emulsan) แจลแลน (gellan) แซนแทน (xanthan) กรดไฮยาลูรอนิก (hyaluronic acid) เป็นต้น (Sutherland, 1990) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่ผลิตเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (ตารางที่ 5)

3.4 *การจำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิเมอร์* โดยทั่วไปนิยมใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์ Moo-Yang (1985 อ้างโดย วีรพันธุ์ เดิมหลิ่ม และพูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) จำแนกพอลิแซคคาไรด์ตามประจุไฟฟ้าเป็น 3 ประเภท ได้แก่

3.4.1 พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic หรือ acidic polysaccharide) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีส่วนของกรดยูโรนิค กรดอินทรีย์หรือหมู่อะซีติล เป็นองค์ประกอบนอกเหนือจากน้ำตาล เช่น แซนแทนประกอบด้วยกลูโคส แมนโนส กรดกลูคูโรนิก ไพรูเวท และหมู่อะซีทิลอยู่บนโมเลกุล

3.4.2 พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์อย่างเดียว เช่น ลีแวน พูลลูแลน เด็กซ์แทรน สเคลอโรกลูแคน ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคส ไม่ได้มีกรดยูโรนิก หรือหมู่อะซีทิลอยู่ในโมเลกุล

3.4.3 พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นบวก (cationic หรือ basic polysaccharide) พอลิแซคคาไรด์ชนิดนี้มีการพบน้อยมาก เช่น ไคโตแซน (พอลิกลูโคซามีน) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา อันดับ Mucorales เช่น *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea* จะมีประจุบวกเนื่องจากหมู่อะมิโน (Sandford, 1979)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทเฮทเทอโรพอลิเมอร์

สายพันธุ์จุลินทรีย์	องค์ประกอบทางเคมี
Alcaligenes cupidus KT 201	glucose, galactose, glucuronic acid, acetic acid
Bacillus sp. DP-152	glucose, mannose, galactose, fucose, acetic acid, pyruvic acid, uronic acid
Enterobacter sp. BY-29	glucose, galactose, xylose, galacturonic acid
Enterobacter sp.	glucose, mannose, rhamnose, fucose, galacturonic acid, glucuronic acid
Paecilomyces sp. I-1	galactosamine, acetyl, formyl
Pestalotiopsis sp. KCTC 8637P	glucose, glucosamine, glucuronic acid, rhamnose
Mixed culture of *Oerkovia*, *Acinetobacter*, *Agrovacterium* and *Enterobacter*	glucose, galactose, succinic acid, pyruvic acid
Lactobacillus sake O-1	glucose, rhamnose
Lactobacillus casei CG-11	glucose, rhamnose, mannose, galactose
Agrobacterium sp.	glucose, mannose, rhamnose
Azotobacter vinelandii MTCC 2460	glucose, galactose, fucose, glucuronic acid

ที่มา : ดัดแปลงจาก Dermlim (1999)

Central Library
Prince of Songkla Unive

วัตถุประสงค์

1. แยกและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้
2. ศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

<u>วัตถุดิบ</u>

1. ตัวอย่างกากตะกอน ดิน และน้ำ จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเลภายในจังหวัดสงขลา ได้แก่ บริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด (มหาชน) ,บริษัทคิงฟีชเชอร์โฮลดิ้ง จำกัด, บริษัทณรงค์ซีฟูด จำกัด, และบริษัทสงขลาแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน), บริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) และบริษัทไฮไทซีฟูด จำกัด

2. ตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำยางข้น ได้แก่ บริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยาง จำกัด และ บริษัทเฟลเท็กซ์ จำกัด

3. ตัวอย่างน้ำและดินจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของเทศบาลหาดใหญ่ จ.สงขลา

4. ตัวอย่างน้ำและดินจากบ่อน้ำพุร้อน กิ่งอำเภอนบพิตำ จ.นครศรีธรรมราช

5. จุลินทรีย์ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่แยกได้โดย Dermlim (1999)

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน (Protein polymer-producing medium : PR) (Takeda *et al.*, 1992) ประกอบด้วย กลูโคส 1 %, ยีสต์สกัด 0.4 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 % และ Na_2HPO_4 0.6 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0

2.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิด (Polyglutamic acid polymer-producing medium : PGA) (Yokoi *et al.*, 1995) ประกอบด้วย กลูโคส 2 %, ยีสต์สกัด 0.05 %, กรดกลูตามิก 5 %, และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0

3.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิไลซีน (Polylysine polymer-producing medium : PL) (Kunioka, 1997) ประกอบด้วย กลูโคส 2 %, กรดซิตริก 2 %, $(NH_4)_2SO_4$ 1 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0

4.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide polymer-producing medium : PS) (Yokoi, 1997) ประกอบด้วย กลูโคส 2 %, พอลิเปปโทน 1 %, ยีสต์สกัด 0.05 %, KH_2PO_4 0.2 % และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0

5.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดไกลโคโปรตีน (Glycoprotein polymer-producing medium : GP) (Lee *et al.*, 1995) ประกอบด้วย กลูโคส 1 %, ยีสต์สกัด 0.2 %, NH_4Cl 0.1 %, $MgSO_4.7H_2O$ 0.01 % และ $MnSO_4.4H_2O$ 0.05 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0

6.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดไกลโคลิปิด (Glycolipid polymer-producing medium : GL) (Kurane *et al.*, 1986) ประกอบด้วย กลูโคส 1 %, ยูเรีย 0.05 %, ยีสต์สกัด 0.05 %, K_2HPO_4 0.5 %, KH_2PO_4 0.2 % $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 % และ NaCl 0.01 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 9.5

สำหรับน้ำตาลกลูโคสในอาหารต่าง ๆ ในการฆ่าเชื้อต้องแยกออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ โดยฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ส่วนยูเรียให้กรองแยกเชื้อก่อนนำไปรวมกับส่วนประกอบอื่น ๆ และในกรณีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้เติมวุ้นผงปริมาณ 1.5 %

<u>สารเคมี</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ ได้แก่ ลิวซีน (L - leucine), ทริปโตแฟน (L-tryptophan), นินไฮดริน (ninhydrin), กรดไนตริก, ฟีนอล และกรดซัลฟิวริก

2. ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน เมทานอล เฮกซาดีเคน เฮกเซน ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม ไอโซออกเทน เบนซีน อะซิโตไนไตร์ล และเอทิลอะซิเตท

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น CG 825 ยี่ห้อ Schott
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS 325 ยี่ห้อ Tomy
3. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น Mov. 212 ยี่ห้อ Sanyo
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator-shaker) รุ่น M. 3525-1 ยี่ห้อ Lab-Line
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 ยี่ห้อ Hitachi
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) รุ่น 5403 ยี่ห้อ Eppendorf
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (electronic balance) รุ่น BP 210s ยี่ห้อ Satorius
8. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus
9. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น SB-651 ยี่ห้อ EYELA

การวิเคราะห์

1. การวัดการเจริญของเชื้อและการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

วัดการเจริญของเชื้อโดยนำน้ำหมักมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) และหาความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{660} กับมวลชีวภาพ สำหรับมวลชีวภาพหาได้โดยนำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x *g* นาน 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{660} และมวลชีวภาพ (ดัดแปลงจาก Van Den Berg, *et al.*, 1995 ; Badr - Eldin *et al.*, 1994)

2. การวัดผลผลิตของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

หลังจากแยกเซลล์ออกน้ำหมักแล้ว นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรน้ำหมัก ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (10,614 x *g*) นาน 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้นำมาอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และชั่งหาน้ำหนัก (ดัดแปลงจาก Dermlim, 1999)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์

3.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

- กรดอะมิโนชนิดแอลฟา วิเคราะห์โดยวิธี Ninhydrin reaction (Plummer, 1978)

- กรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก วิเคราะห์โดยวิธี Xanthoproteic reaction (Plummer, 1978)

3.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

- น้ำตาลทั้งหมด วิเคราะห์โดยวิธี Phenol - sulfuric acid reaction (Dubois *et al.*, 1956)

- การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุหลักด้วยเครื่อง CHNS-O Analyzer (FLASH 1112 Series EA)

ชั่งตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์น้ำหนัก 2-3 มิลลิกรัม บรรจุในถ้วยดีบุก (tin cup) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างอีกครั้ง นำตัวอย่างที่ทราบค่าน้ำหนักที่แน่นอนไปเผาในเตาเผา ซึ่งภายในมีขดลวดให้ความร้อน และมีก๊าซออกซิเจน (99.99999%) ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการเผาไหม้ อุณหภูมิที่ใช้ในการเผาไหม้สำหรับการหาปริมาณคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ (CHNS-mode) คือ 900 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการเผาไหม้สำหรับการหาปริมาณออกซิเจน (O_2-mode) คือ 1,060 องศาเซลเซียส ผลผลิตที่ได้จากการเผาไหม้ คือ ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และน้ำ (H_2O) ก๊าซที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะถูกแยกโดยคอลัมน์ (Multi-seperator column) ก่อนผ่านเข้าเครื่องดีเทคเตอร์ หลักการการทำงานของเครื่อง คือ วัดความแตกต่างของค่าการนำความร้อนระหว่างก๊าซตัวพา (ก๊าซฮีเลียม 99.99999%) และก๊าซตัวอย่าง ดีเทคเตอร์ที่ใช้ คือ Thermal Conductivity Detector (TCD) สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งต่อไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อนำไปประมวลผลต่อไป ในการทดลองทุกครั้งต้องเตรียมกราฟมาตรฐาน นิยมใช้สารอินทรีย์ เช่น กรดอินทรีย์ หรือ กรดอะมิโน ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ในการทดลองครั้งนี้ใช้เมไธโอนีน ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

- การวิเคราะห์กรดอะมิโน โดย Accq. Tag Method

ย่อยพอลิเมอร์ตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย 6 N HCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วยสารละลายเข้มข้น NaOH ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำมากรองซ้ำอีกครั้งด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาทำ Derivtized และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายที่เตรียมได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้า เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Waters) คอลัมน์ที่ใช้ คือ Accq. Tag Column ดีเทคเตอร์ที่ใช้ คือ ฟลูออเรสซีน (Fluorescene) โดยใช้อะซิโตไนไตร์ล และน้ำเป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase)

4. การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรองสารละลายพอลิเมอร์โดยใช้กระดาษกรอง (Millipore Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดสารละลายพอลิเมอร์ที่ผ่านการกรองแล้วเข้าเครื่อง GPC (PL-GPC 110, Polymerlab) สภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลอง คือ ใช้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร (flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้น้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (deionized water) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ฉีดสารละลายพอลิเมอร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเครื่องสามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ในช่วง 1,000 – 20,000,000 ดาลตัน และใช้พอลลูแลน (น้ำหนักโมเลกุล 5,800 – 1,660,000 ดาลตัน) เป็นพอลิเมอร์มาตรฐาน หลักการการทำงานของเครื่อง คือ แยกพอลิเมอร์ตามขนาดโมเลกุล ดีเทคเตอร์ที่ใช้ คือ Differential Refractometer (RI detector) สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งต่อไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อนำไปประมวลผลต่อไป

5. การวัดค่ากิจกรรมการตกตะกอน

ผสมน้ำหมักหรือสารละลายพอลิเมอร์ 0.1 มิลลิลิตร, 90 มิลลิลโมลาร์ $CaCl_2$ 0.25 มิลลิลิตร และ 5 กรัมต่อลิตรสารแขวนลอยของดินขาว (kaolin suspension) 4.65 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันในหลอดทดลอง (ขนาด 8 มิลลิเมตร x 90 มิลลิเมตร) ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที ดูดสารละลายผสม

ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากส่วนบนสุดของหลอดทดลอง นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (OD_{550}) สำหรับชุดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำหมักหรือสารละลายพอลิเมอร์ (Yokoi *et al.*, 1995)

คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอนโดยใช้สมการ

ค่ากิจกรรมการตกตะกอน = $1/(OD_{550})_S - 1/(OD_{550})_C$

อัตราการตกตะกอน (%) = $(OD_{550})_c - (OD_{550})_s / (OD_{550})_c \times 100$

$(OD_{550})_S$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง (น้ำหมักหรือสารละลายพอลิเมอร์)

$(OD_{550})_C$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรของชุดควบคุม

วิธีการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์

1.1 การแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างดิน น้ำ จากบ่อน้ำพุร้อน, ระบบบำบัดน้ำเสียรวมของเทศบาลหาดใหญ่ และโรงงานผลิตน้ำยางข้น รวมทั้งตัวอย่างกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลในเขตจังหวัดสงขลา บันทึกคุณลักษณะของตัวอย่างที่นำมาใช้ ได้แก่ สี, พีเอช, และอุณหภูมิ นำตัวอย่างที่ได้มาแยกเชื้อโดยเขี่ยตัวอย่างบนอาหารแข็งสำหรับแยกเชื้อทั้ง 6 ชนิด (PGA, PS, GP, GL, PR และ PL) ในอัตราการเจือจางในระดับความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-3} บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเมือก ถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้บนอาหารแข็งชนิดเดียวกับที่ใช้ในการแยกเชื้อแต่ละชนิด เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน

1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูง

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยบ่มเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้บนอาหารแข็งที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสายพันธุ์นั้น ๆ นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง วัดค่าพีเอช น้ำหนักของเซลล์แห้ง และผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้ คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสูงสุด 10 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาต่อไป

1.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ทนร้อนของจุลินทรีย์ที่แยกได้

นำเชื้อที่คัดเลือกไว้ 10 สายพันธุ์ มาศึกษาคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสายพันธุ์นั้น ๆ ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส และใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1.2 เปรียบเทียบการเจริญและผลผลิตพอลิเมอร์ที่ได้ คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญและผลิตพอลิเมอร์ได้ดีทั้งสองอุณหภูมิจำนวน 3 สายพันธุ์ มาศึกษาต่อไป

1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการในหนังสืออนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ (ดวงพร คันธโชติ, 2537) ร่วมกับการใช้ชุดทดสอบ api 20 E ของบริษัท bioMerieux

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์

2.1 การทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงจำนวน 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (ในข้อ 1.3) ตามวิธีการในข้อ 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำหมักไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,614 x *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการลดปริมาณ

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต้องใช้ในการตกตะกอนพอลิเมอร์ ตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากสารละลายส่วนใสด้วยการเติมอะซิโตนที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 4 เท่าของสารละลายที่ได้ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,614 x *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกตะกอนของพอลิเมอร์ นำตะกอนของพอลิเมอร์ที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้ freeze dryer จากขั้นตอนนี้จะได้ crude polymer ละลาย crude polymer ที่ได้ในน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (deionized water) เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,614 x *g* นาน 15 นาที กำจัดเกลือโดยใช้วิธีไดอะไลซีส (dialysis) และนำสารละลายพอลิเมอร์ไปทำแห้งอีกครั้งด้วย freeze dryer จะได้พอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจาก Goto and Kunioka, 1992)

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์

นำพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 3 ได้แก่ การวิเคราะห์กลุ่มอัลฟาอะมิโน (Ninhydrin reaction) กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (Xanthoproteic reaction) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Phenol-sulfuric acid reaction) การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุหลัก (คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และไฮโดรเจน) และการวิเคราะห์กรดอะมิโนภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์

2.3 การหาน้ำหนักโมเลกุล โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 4

2.4 การวัดค่ากิจกรรมการตกตะกอน โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5

2.5 คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์

ทดสอบความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน เบนซีน คลอโรฟอร์ม เฮกเซน เฮกซาดีเคน ไอโซออกเทน เอทิลอะซิเตต และอะซิโตไนไตรล์ โดยใช้ความเข้มข้นของ พอลิเมอร์ 1 มิลลิกรัม ต่อตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร สังเกตการละลายของพอลิเมอร์หลังจากตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน โดยเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ไม่มีการเติมพอลิเมอร์ (Collins *et al.*, 1973)

3. เปรียบเทียบการเจริญและผลผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงจำนวน 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (ในข้อ 1.3) มาศึกษาการเจริญโดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1.2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน วัดค่าพีเอช และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารที่ใช้ทั้งสองสูตร

3.2การศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ (ในข้อ 1.3) โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 1.2 และทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ตามวิธีการในข้อ 2

3.3 การคัดเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการตกตะกอนพอลิเมอร์

เลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 1.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาผลผลิตพอลิเมอร์ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ อะซิโตน เมทานอล และ เอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์) ในการตกตะกอน เปรียบเทียบผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้เพื่อคัดเลือกชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม

3.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ (ในข้อ 1.3) โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 1.2 และทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ตามวิธีการในข้อ 2

บทที่ 3

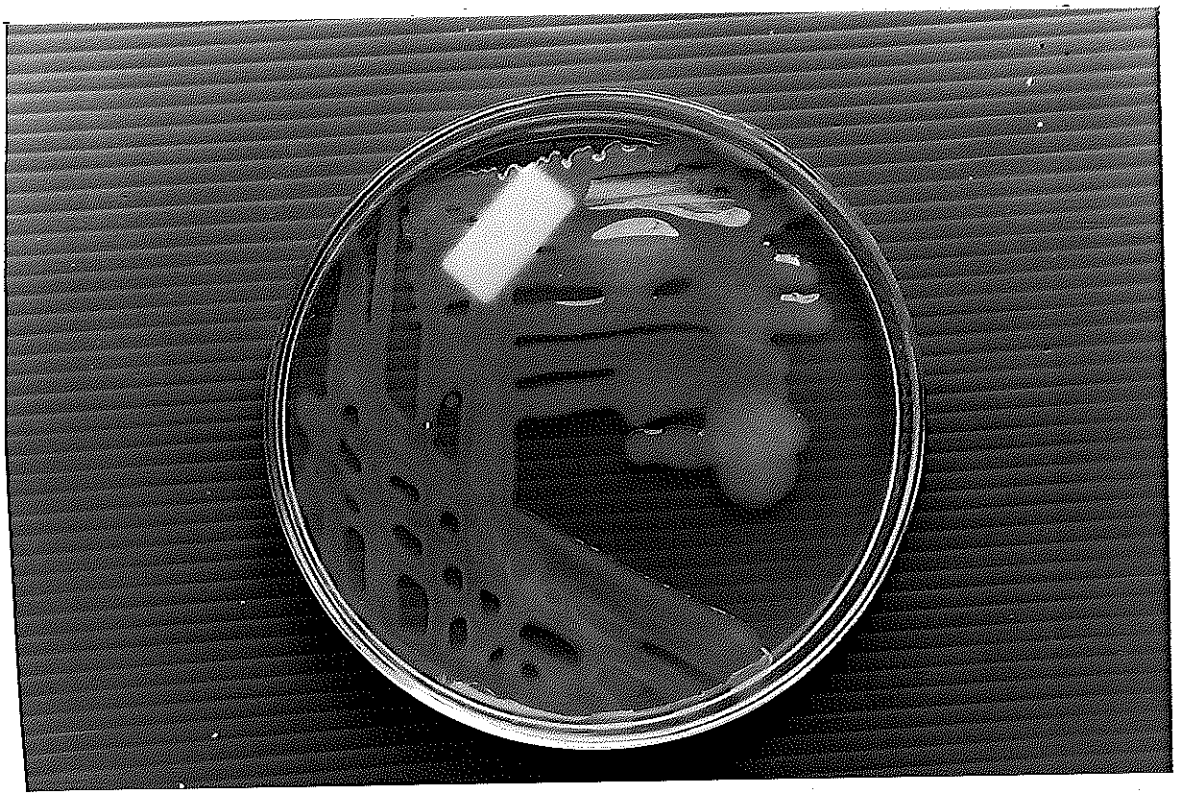
ผลและวิจารณ์

1. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์

1.1 การแยกเชื้อ

จากตัวอย่างจำนวน 53 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 6 สูตร เพื่อเพิ่มความหลากลาย และเพิ่มโอกาสในการได้เชื้อที่ต้องการ เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (6 สูตร) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเหนียวเป็นเมือก หรือเป็นยางคล้ายกาว (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นลักษณะของจุลินทรีย์ที่มีแนวโน้มว่าจะสร้างสารพอลิเมอร์ (สมใจ ศิริโภค, 2537) ผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 6) พบว่า สามารถแยกเชื้อได้ 54 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น เชื้อที่เจริญบนอาหารสูตร PGA จำนวน 42 สายพันธุ์ เชื้อที่เจริญบนอาหารสูตร PS จำนวน 4 สายพันธุ์ เชื้อที่เจริญบนอาหารสูตร GL จำนวน 4 สายพันธุ์ เชื้อที่เจริญบนอาหาร PR จำนวน 3 สายพันธุ์ เชื้อที่เจริญบนอาหารสูตร GP จำนวน 1 สายพันธุ์ และไม่พบว่ามีจุลินทรีย์เจริญบนอาหารสูตร PL

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ ตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลในจังหวัดสงขลา (SK,KF, KST, CMC, NR, TR, S) ตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำยางข้น (CH, FT) ตัวอย่างน้ำจากแหล่งธรรมชาติ (น้ำพุร้อน และ น้ำทะเล) ตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมเทศบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และจุลินทรีย์ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกโดย Dermlim (1999) จากผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 29 สายพันธุ์จากตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล 18 สายพันธุ์จากตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำยางข้น 2 สายพันธุ์จากตัวอย่างเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ และ 5 สายพันธุ์จากจุลินทรีย์ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกโดย Dermlim (1999) ส่วนตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของเทศบาลหาดใหญ่ไม่พบว่ามีจุลินทรีย์ที่สร้างเมือกเจริญ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระบบบำบัดยังไม่พร้อมเปิดรับน้ำเสียจากชุมชนในขณะที่ไป



ภาพที่ 3 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่แยกได้เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้
1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิด (Polyglutamic acid polymer-producing medium : PGA)	42
2.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide polymer-producing medium : PS)	4
3.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดไกลโคลิปิด (Glycolipid polymer-producing medium :GL)	4
4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน (Protein polymer-producing medium : PR)	3
5.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดไกลโคโปรตีน (Glycoprotein polymer-producing medium : GP)	1
6.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิไลซีน (Polylysine polymer-producing medium : PL)	None
รวม	54

ตารางที่ 7 จำนวนจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

รหัสแหล่งตัวอย่าง	PGA	GP	GL	PS	PR	PL	รวม
น้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล จังหวัดสงขลา							
1. SK	3	-	-	-	1	-	4
2. KF	7	-	2	-	-	-	9
3. KST	2	-	1	-	-	-	3
4. CMC	2	-	1	-	-	-	3
5. NR	4	-	-	-	-	-	4
6. TR	-	1	-	3	-	-	4
7. S	2	-	-	-	-	-	2
น้ำเสียจากโรงงานน้ำยางข้น							
1. CH	7	-	-	-	1	-	8
2. FT	9	-	-	-	1	-	10
อื่น ๆ							
1.น้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมเทศบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (HY)	-	-	-	-	-	-	-
2. น้ำพุร้อน (HS)	1	-	-	-	-	-	1
3. น้ำทะเล จ. สุราษฎร์ธานี (SURAT)	1	-	-	-	-	-	1
4. จุลินทรีย์ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่แยกโดย Dermlim (1999)	4	-	-	1	-	-	5
รวม	42	1	4	4	3	-	54

SK แทน บ. สงขลาแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน)
KST แทน บ. ห้องเย็นโชติวัฒน์หาดใหญ่ จำกัด
KF แทน บ.คิงฟีชเชอร์โฮลดิ้ง จำกัด
CMC แทน บ.โชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด
TR แทน บ. ทรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)
NR แทน บ.ณรงค์ชีฟูด จำกัด
S แทน บ.ไฮไทชีฟูด จำกัด
CH แทน บ.ฉลองอุตสาหกรรมน้ำยาง จำกัด
FT แทน บ. เฟลเท็กซ์ จำกัด

ทำการเก็บตัวอย่าง จุลินทรีย์ที่มีอยู่จึงไม่มีความหลากหลายมากนัก และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จากการที่สามารถแยกจุลินทรีย์ที่สร้างสารเมือกได้จำนวนหลายสายพันธุ์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง เนื่องจากตะกอน (floc) ที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมีแบคทีเรียมากกว่า 300 สายพันธุ์เจริญอยู่ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะใช้สารอินทรีย์ รวมทั้งเปลี่ยนรูปของสารอาหารต่าง ๆ ที่อยู่ในระบบ และสามารถผลิตสารพอลิเมอร์หลายชนิด แบคทีเรียที่พบส่วนมากได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Zooglea, Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Bacillus, Archromobacter, Corynebacterium, Comomonas, Brevibacterium* และ *Acinetobacter* (Bitton, 1994)

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ที่แยกได้ ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ เช่น *Klebsiella* sp. (Dermlim *et al.*, 1999), *Rahnella aquatilis* (Matsuyama *et al.*, 1999), *Klebsiella oxytoca* (Dlamini and Peiris, 1997), *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterobacter amnigenus* (Tallgren, *et al.*, 1999), *Bacillus subtilis* TAM-4 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิด (Ito *et al.*, 1996), *Streptomyces albulus* ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิไลซีน (Shima and Sakai, 1981) และ *Arcudendron* sp. TS-49 (Lee *et al.*, 1995) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดไกลโคโปรตีน ปัญหาที่สำคัญที่พบในการใช้ จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลางในการผลิตพอลิเมอร์ คือ น้ำหมักมีความหนืดค่อนข้างสูงทำให้ยากต่อการกวน การให้อากาศ และขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการเลือกใช้จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงจึงน่าจะเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหานี้ได้ การใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะช่วยลดพลังงานที่ใช้ในการกวนเนื่องมาจากความหนืดของน้ำหมักที่ลดลง (Brock and Modigan, 1991) แต่จะต้องเพิ่มพลังงานส่วนหนึ่งในการให้ความร้อนแก่ระบบ

1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูง

นำจุลินทรีย์ 54 สายพันธุ์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสายพันธุ์นั้น ๆ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง วัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และผลผลิตพอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้ ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหาร PGA - medium ให้ผลผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 25.02 – 58.08

ตารางที่ 8 ค่าพีเอช, น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ที่แยกได้บนอาหารแต่ละชนิดที่ใช้ในการแยกเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร)
PGA-medium	5.21 – 8.34	0.21 – 2.50	25.20 – 58.08
PS-medium	5.63 – 8.36	1.10 – 1.50	0.66 – 2.57
GP-medium	7.87	0.40	0.13
PR-medium	5.93 – 7.11	1.20 – 1.60	2.86 – 4.41
GL-medium	6.85 – 7.57	1.80 – 2.80	0.54 – 0.56

กรัมต่อลิตร และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 0.21 – 2.50 กรัมต่อลิตร ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่น ๆ ให้ผลผลิตพอลิเมอร์ที่ต่ำกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร PGA-medium โดยจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร PS-medium ให้ผลผลิตพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง 0.66 – 2.57 กรัมต่อลิตร และ 1.10 – 1.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร GP-medium ให้ผลผลิตพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.13 กรัมต่อลิตร และ 0.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร PR-medium ให้ผลผลิตพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง 2.86 – 4.41 กรัมต่อลิตร และ 1.20 – 1.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร GL-medium ให้ผลผลิตพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง 0.54 – 0.56 กรัมต่อลิตร และ 1.80 – 2.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่จะเจริญ และผลิตพอลิเมอร์ได้ดีเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้ในขั้นตอนการแยกเชื้อ โดยสังเกตุได้จากลักษณะของโคโลนีซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่ และมีลักษณะเมือก เยิ้ม และเหนียว แต่เมื่อเจริญในอาหารเหลว พบว่าลักษณะของน้ำหมักที่ได้ไม่หนืดมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์มีความต้องการพื้นที่ผิวในการเจริญเพื่อการสร้างพอลิเมอร์ในลักษณะคล้ายกับไบโอฟิล์ม นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อ อาจจะไม่ใช่อาหารที่เหมาะสมกับการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ เชื้ออาจมีความต้องการสารอาหารชนิดอื่นเพิ่มเติมในการผลิตพอลิเมอร์ และสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้ออาจไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมและดีที่สุดสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ (Dermlim, 1999) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่แยกได้จากนมและหางนม โดยศึกษาผลของไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตพอลิเมอร์จาก 6 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 15 กรัมต่อลิตร (Dlamini and Peiris, 1997) นอกจากนี้ความหนืดของน้ำหมักเพิ่มจาก 36 cP ที่ specific shear rate 12 ต่อวินาที ไปเป็น 20,000 cP ที่ specific shear rate 0.6 ต่อวินาที (Peiris *et al.*, 1998) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้ออาจไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อต่อไป

จากผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 9) เลือกจุลินทรีย์สามารถที่ผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุด 9 สายพันธุ์แรก ได้แก่ สายพันธุ์ SM 13, SM 52, SM 29, SM 34, SM 25, SM 30, SM 37, SM 26, SM 42 และอีก 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน คือ SM 21 เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในน้ำพุร้อน ซึ่งมีอณหภูมิค่อนข้างสูง (54 องศาเซลเซียส) นำจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ทนร้อนโดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ทนร้อนของจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ ได้แก่ จุลินทรีย์สายพันธุ์ SM 13, SM 52, SM 29, SM 34, SM 25, SM 30, SM 37, SM 26, SM 42 และ SM 21 ในอาหารสูตร PGA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตพอลิเมอร์ได้ทั้งสองอุณหภูมิ (ตารางที่ 10) โดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ (SM 13, SM 29, SM 34 และ SM 25) ให้ค่าผลผลิตพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีเฉพาะจุลินทรีย์สายพันธุ์ SM 52 เท่านั้นที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้จุลินทรีย์สายพันธุ์ SM 25 สามารถเจริญและให้ค่าน้ำหนักแห้งเท่ากันทั้งสองอุณหภูมิ จากเชื้อ 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ เชื้อจำนวน 5 สายพันธุ์ (50%) ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ต่ำกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร และเนื่องจากจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถเจริญและผลิตพอลิเมอร์ได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส จึงสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์จัดเป็นจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง จุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิด (PGA) ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophile bacteria) ได้แก่ *Bacillus subtilis* IFO 3335 (Goto and Kunioka, 1992), *Bacillus subtilis* TAM-4 (Ito *et al.*, 1996), *Bacillus subtilis* F-2-01 (Kubota *et al.*, 1993) และ *Bacillus licheniformis* A 35 (Cheng *et al.*, 1989) จากผลการทดลองที่ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูงสุดเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้แก่ จุลินทรีย์สายพันธุ์ SM 13, SM 52 และ SM 29

ตารางที่ 9 ค่าพีเอช, น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จำนวน 54 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้	รหัสตัวอย่างเชื้อที่แยกได้[a]	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร)
PGA-medium	SM 13	FT 1.2	5.22	1.94	58.08
	SM 52	WD 90	5.59	2.39	55.27
	SM 29	KF 4.1	6.04	1.90	54.45
	SM 34	NR 1.1	5.85	0.26	53.22
	SM 25	KF 3.1.1	8.51	1.37	52.39
	SM 30	KF 4.2.2	5.66	0.45	50.88
	SM 37	NR 2.2	7.42	0.33	50.64
	SM 26	KF 3.1.2	8.32	0.42	49.98
	SM 42	SURAT	7.82	0.49	49.40
	SM 38	SK 4.1	6.33	0.48	49.27
	SM 6	CH 10	7.39	1.85	49.05
	SM 36	NR 2.1	5.89	0.56	48.50
	SM 1	CH 5	6.75	1.55	48.06
	SM 8	CMC 2.1	7.26	1.31	47.84
	SM 50	WD 79	5.63	0.94	47.66
	SM 9	CMC 2.2	5.95	2.51	47.63
	SM 32	KST 1.2	7.81	0.01	47.52
	SM 27	KF 3.1.3	8.45	0.54	47.66
	SM 19	FT 5	7.79	1.89	46.65
	SM 51	WD 85	5.97	0.28	46.53
	SM 5	CH 9	8.25	1.03	46.38
	SM 16	FT 3.1	6.39	1.10	46.16
	SM 7	CH 11	5.96	1.35	45.68
	SM 20	FT 6	7.74	1.81	44.96
	SM 4	CH 8	8.92	2.03	44.95
	SM 14	FT 2	7.81	1.88	44.83
	SM 35	NR 1.2	6.40	0.46	44.08

ตารางที่ 9 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้	รหัสตัวอย่างเชื้อที่แยกได้[a]	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร)
PGA-medium	SM 11	FT 1	7.77	1.54	43.69
	SM 17	FT 3.2	8.02	2.47	43.50
	SM 21	HS 2	8.11	1.65	43.09
	SM 31	KST 1.1	8.34	1.02	42.90
	SM 22	KF 2	8.24	0.36	42.50
	SM 49	WD 48	7.93	1.37	42.42
	SM 43	S 1.1	7.44	1.39	41.02
	SM 2	CH 6	6.72	1.72	40.88
	SM 41	SK 7.3	5.76	0.32	39.86
	SM 28	KF 3.2	7.96	1.68	38.94
	SM 3	CH 7	8.21	1.55	38.24
	SM 18	FT 4	7.80	1.51	35.84
	SM 40	SK 7.1	5.69	0.38	34.70
	SM 12	FT 1.1	5.21	0.97	31.69
	SM 44	S 1.2	8.17	0.21	25.02
PS-medium	SM 49	WD 48	7.93	1.10	2.57
	SM 47	TR 3.2	8.08	1.22	1.77
	SM 46	TR 3.1	5.63	1.32	1.00
	SM 48	TR 3.3	8.36	1.51	0.66
GP-medium	SM 45	TR 3	7.87	0.43	0.13
PR-medium	SM 7	CH 11	6.10	1.57	4.41
	SM 39	SK 5.1	7.11	1.27	4.37
	SM 15	FT 3	5.93	1.54	2.86
GL-medium	SM 10	CMC 2.4	7.31	2.78	0.56
	SM 33	KST 2.3	7.37	1.79	ปริมาณเล็กน้อย
	SM 23	KF 2.1	7.57	1.32	ปริมาณเล็กน้อย
	SM 24	KF 2.2	6.85	1.27	ปริมาณเล็กน้อย

ตารางที่ 10 ผลผลิตพอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อเจริญในอาหารสูตร PGA ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		ผลผลิตพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร)	
สายพันธุ์จุลินทรีย์	30 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
SM 13	2.06	1.94	51.96	58.08
SM 52	1.87	2.39	61.45	55.27
SM 29	2.13	1.90	49.13	54.45
SM 34	2.68	0.26	50.43	53.22
SM 25	1.38	1.37	51.92	52.39
SM 30	3.03	0.45	58.83	50.88
SM 37	1.63	0.33	55.71	50.64
SM 26	1.49	0.42	51.76	49.98
SM 42	1.76	0.49	55.98	49.40
SM 21	2.75	1.65	46.09	43.09

1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (ตารางที่ 11) สามารถจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ SM 13, SM 29 และ SM 52 ได้เป็น *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Bacillus subtilis* SM 52 ตามลำดับ

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์

2.1 การทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์

นำจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูงสุด คือ *Protues mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 52 และ *Bacillus subtilis* SM 29 มาเลี้ยงในอาหารสูตร PGA ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บเกี่ยวพอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตและทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์ โดยใช้อะซิโตน (ปริมาตร 4 เท่า) ตกตะกอน พอลิเมอร์ออกจากน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกแล้ว นำพอลิเมอร์ไปทำแห้ง (freeze dry) ละลายพอลิเมอร์ที่ได้ในน้ำและแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก นำไปไดอะไลซีส และทำแห้งอีกครั้ง จะได้พอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ ปริมาณพอลิเมอร์ที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13, *Bacillus subtilis* SM 52 และ *Bacillus subtilis* SM 29 ผลิตได้ คือ 54.06, 55.08 และ 55.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์ ปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้ คือ 33.45, 34.83 และ 36.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นผลผลิตพอลิเมอร์ในรูปบริสุทธิ์ เท่ากับ 61.88, 63.24 และ 65.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ของผลผลิตพอลิเมอร์ที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะมีสีขาวนวล (ภาพที่ 4, 5 และ 6)

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์

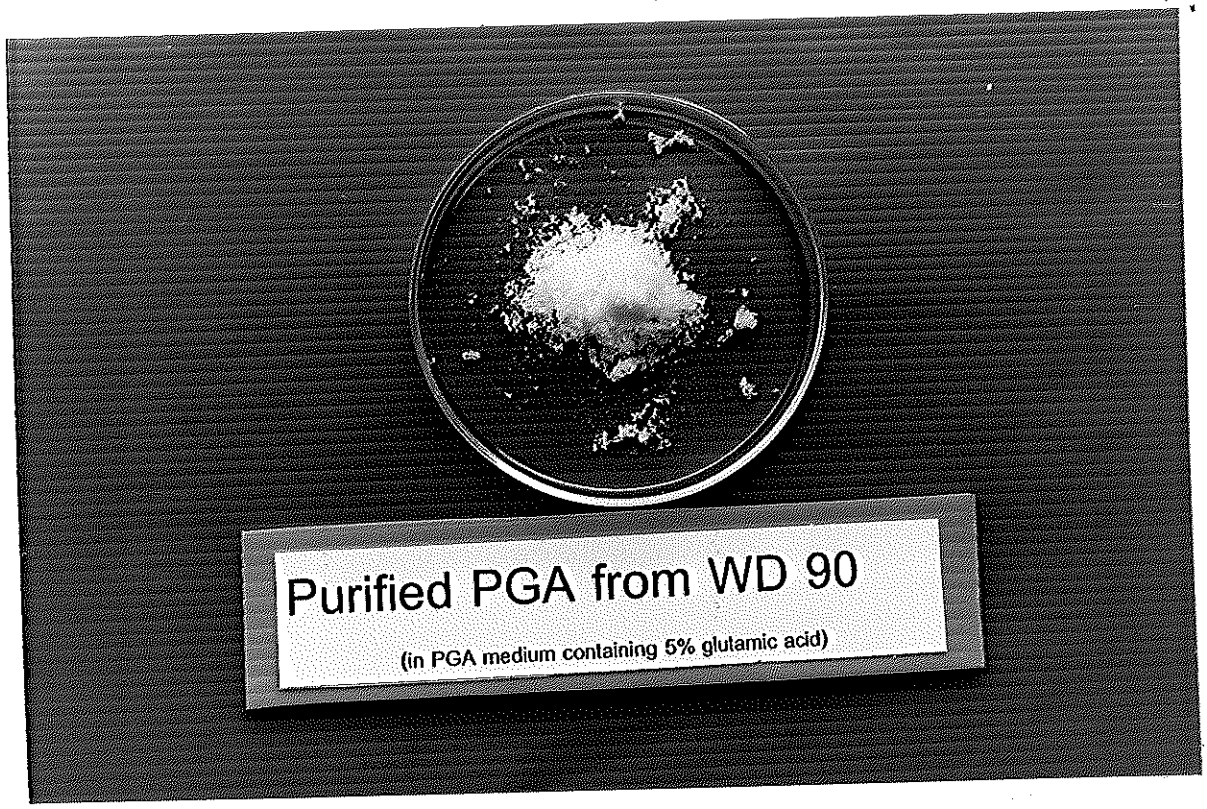
วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธีการ Colorimetric Method ผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 12) พบว่า พอลิเมอร์จากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52, *Proteus mirabilis* SM 13 และ *Bacillus subtilis* SM 29 ประกอบด้วยกลุ่มอัลฟาอะมิโนภายในโมเลกุล โดยไม่พบกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก และประกอบด้วยน้ำตาล (total sugar) ปริมาณ 9.48, 12.99 และ 13.27 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยใช้วิธีทางชีวเคมี

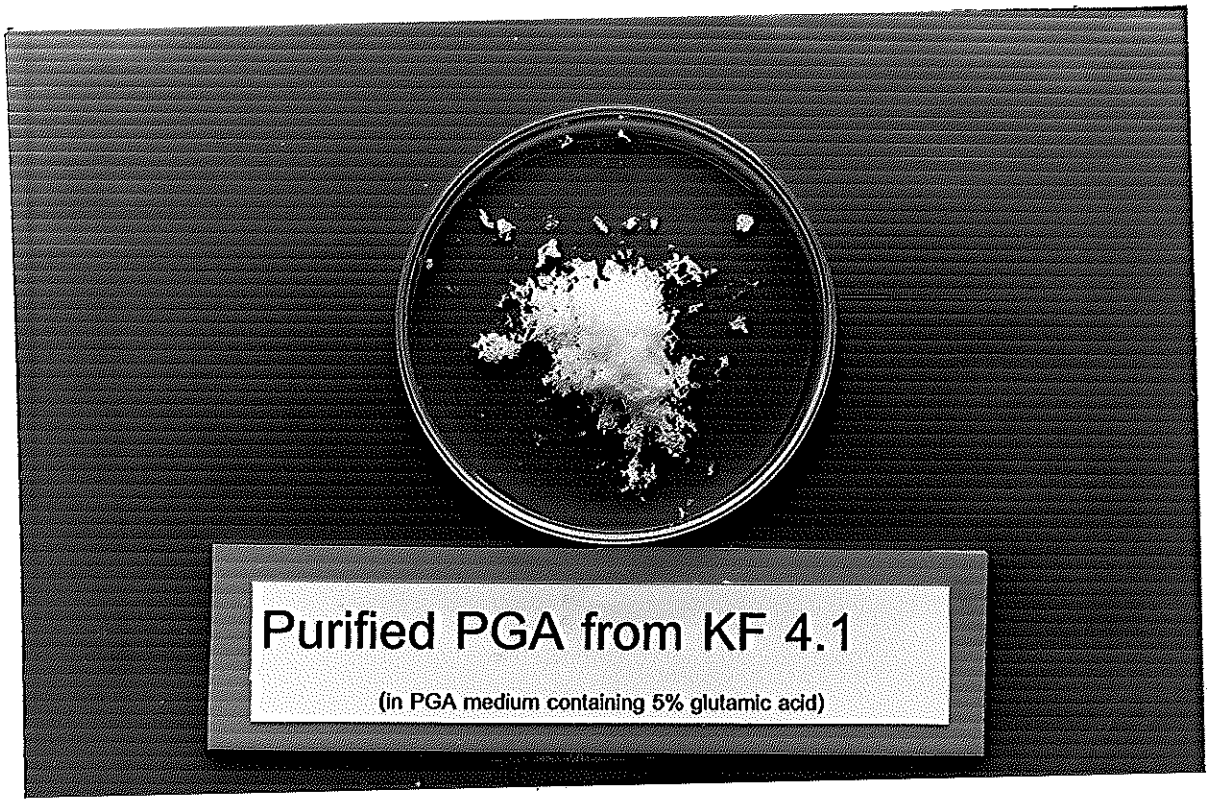
การทดสอบ	สายพันธุ์ SM 13	สายพันธุ์ SM 29	สายพันธุ์ SM 52
การติดสีแกรม	แกรมลบ	แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่างของเซลล์	แท่ง (rod)	แท่ง (rod)	แท่ง (rod)
การสร้างสปอร์	-	+(cylindrical, central)	+ (cylindrical, central)
การเคลื่อนที่ (motility)	+	+	+
ความต้องการออกซิเจนในการเจริญ (O_2 requirement)	+	+	+
การทดสอบแคตาเลส (catalase)	-	+	+
การทดสอบออกซิเดส (oxidase)	-	-	-
การทดสอบวีพี (Voges-Proskauer (VP))*	-	+	+
การทดสอบอินโดล (indole)*	+	-	-
การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate)*	+	-	-
การทดสอบการย่อยเยลาติน (gelatin liquefaction)*	-	+	+
การทดสอบการย่อยเคซีน (casein hydrolysis)	-	+	+
การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)	+	+	+
การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)	-	-	-
การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)*	-	-	-
การทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส	F	-	-
การทดสอบการออกซิไดซ์และหมักน้ำตาล*			
- กลูโคส (glucose)	+	+	+
- แมนนิทอล (manitol)	-	+	+
- อินโนซิทอล (inositol)	-	-	-
- ซอร์บิทอล (sorbitol)	-	-	-
- ซูโครส (sucrose)	-	+	+
- อะราบิโนส (arabinose)	-	-	-
สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้เป็น	*Proteus mirabilis* SM13	*Bacillus subtilis* SM29	*Bacillus subtilis* SM52

หมายเหตุ : + แทน positive result, - แทน negative result, F แทน fermentation

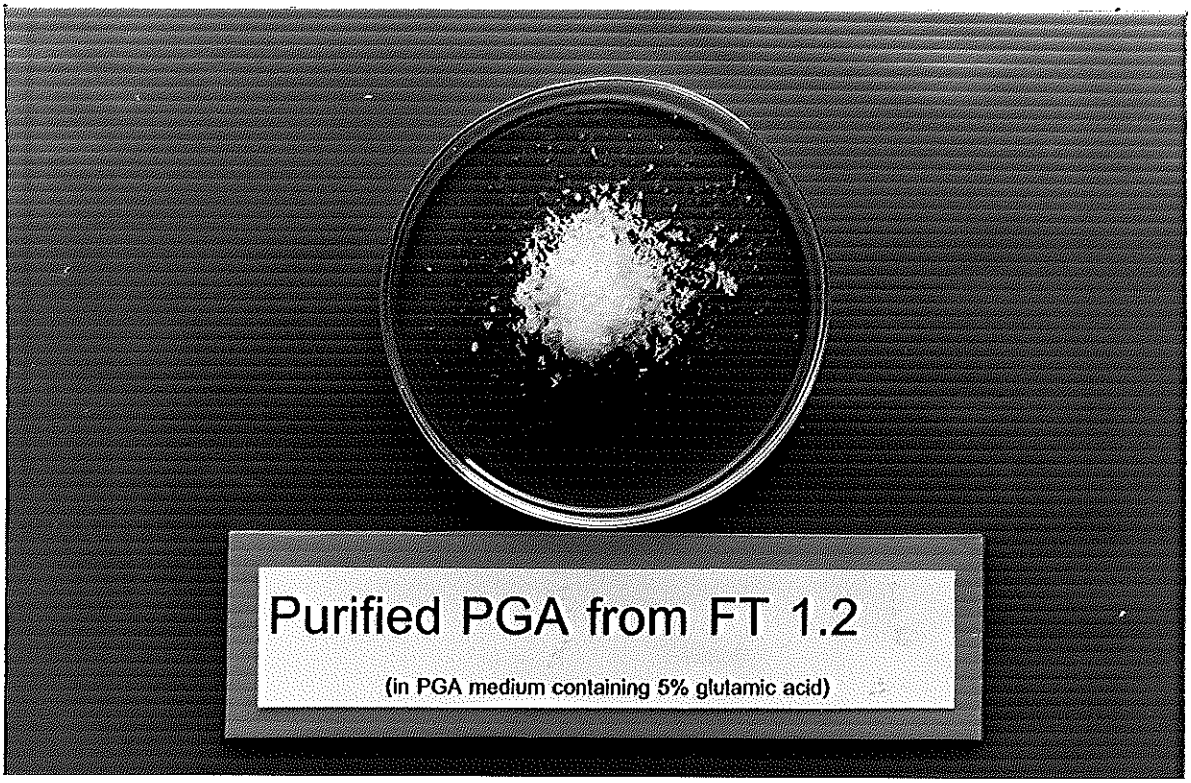
* เป็นผลการทดลองที่ได้จากการใช้ชุดทดสอบ api 20 E



ภาพที่ 4 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จาก *Bacillus subtilis* SM 52



ภาพที่ 5 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จาก *Bacillus subtilis* SM 29



ภาพที่ 6 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จาก *Proteus mirabilis* SM 13

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

วิธีการ	วิเคราะห์	พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์		
		Proteus mirabilis SM 13	*Bacillus subtilis* SM 29	*Bacillus subtilis* SM 52
1. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ				
- Ninhydrin reaction	กลุ่มอัลฟาอะมิโน	+	+	+
- Xanthoproteic reaction	กรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก	-	-	-
2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ				
- Phenol-sulfuric acid reaction	น้ำตาลทั้งหมด	12.99% (w/w)	13.27% (w/w)	9.48% (w/w)

หมายเหตุ + แทน positive test

- แทน negative test

(โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ จะเห็นว่าพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำปฏิกิริยากับ Ninhydrin (ให้สารสีม่วง) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่ทำปฏิกิริยากับกลุ่มอัลฟาอะมิโนทุกชนิด (Plummer, 1978) วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจสอบกรดอะมิโนและเปปไทด์ได้ (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2530) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีกรดอะมิโนและ/หรือเปปไทด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งถ้าต้องการทราบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดใดบ้างต้องทำการศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนในการศึกษาขั้นต่อไป ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PGA เพื่อใช้ในการผลิตพอลิเมอร์ซึ่งในอาหารมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ น้ำตาลกลูโคส (20 กรัมต่อลิตร) และกรดกลูตามิก (50 กรัมต่อลิตร)

เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TAM-4 พบว่ามีน้ำตาลน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) อยู่ในโมเลกุลของพอลิเมอร์ แสดงว่า *Bacillus subtilis* TAM-4 นอกจากจะผลิตพอลิกลูตามิกแอซิดแล้ว ยังผลิตพอลิแซคคาไรด์ด้วยแต่ผลิตในปริมาณที่น้อยมาก (Ito *et al.*, 1996) ซึ่งแตกต่างจากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52, *Bacillus subtilis* SM 29และ *Proteus mirabilis* SM 13 ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงกว่ามาก เพื่อเป็นการแก้ปัญหาการผลิตพอลิแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้น Goto และ Kunioka (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตพอลิกลูตามิกแอซิดจาก *Bacillus subtilis* IFO 3335 พบว่าการใช้กรดซิตริกในระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร แทนการใช้กลูโคส จะไม่ทำให้เกิดผลพลอยได้ (by-product) ในรูปของพอลิแซคคาไรด์ภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์ แสดงว่ากลูโคสมีผลในการผลิตพอลิแซคคาไรด์ของพอลิเมอร์ของเชื้อค่อนข้างสูง

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุหลักในโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่แยกได้ (ตารางที่ 13) พบว่าพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 29 มีปริมาณคาร์บอน, ไนโตรเจน, ไฮโดรเจน และออกซิเจน 30.99, 5.42, 5.46 และ 52.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ, ในขณะที่พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 มีปริมาณ แร่ธาตุเหล่านี้เท่ากับ 30.97, 5.42, 5.44 และ 48.73 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* FT 1 . 2 มีปริมาณธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และออกซิเจน 30.75, 6.08, 4.22 และ 48.24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีซัลเฟอร์อยู่ในองค์

ตารางที่ 13 ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์ในพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

พอลิเมอร์	ปริมาณ (% โดยน้ำหนัก)				
	คาร์บอน	ไฮโดรเจน	ออกซิเจน	ไนโตรเจน	ซัลเฟอร์
Proteus mirabilis SM 13	30.75	4.22	48.24	6.08	0
Bacillus subtilis SM 29	30.99	5.46	52.71	5.42	0
Bacillus subtilis SM 52	30.97	5.44	48.73	5.42	0

ประกอบ และมีปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และออกซิเจนในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุล (*Bacillus subtilis* SM 52 = 5.8 x 10^4, *Bacillus subtilis* SM 29 = 5.9 x 10^4 และ *Proteus mirablilis* SM 13 = 6.4 x 10^4 ดาลตัน) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้องค์ประกอบของธาตุต่าง ๆ ในโมเลกุลของพอลิเมอร์มีปริมาณใกล้เคียงกันด้วย

การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (ตารางที่ 14) พบว่าพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52, *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Proteus mirablilis* SM 13 ประกอบด้วยกรดกลูตามิกในปริมาณสูงที่สุดโดยคิดเป็นร้อยละ 98.48, 98.26 และ 96.92 ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ นอกจากนั้นยังประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ในปริมาณเล็กน้อย (ประมาณ 0.06 – 0.44 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้)

จากผลการทดลองที่ได้ จึงสามารถสรุปได้ว่า พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์จัดเป็นพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน ที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิกในอัตราส่วนที่มากที่สุด

2.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย Gel Permeation Chromatography

พอลิเมอร์จัดเป็นสารพอลิดิสเพอร์ส (polydisperse) กล่าวคือ พอลิเมอร์ชนิดเดียวกันมีโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน หรือมีโมเลกุลที่มีความยาวโซ่ยาวและสั้นต่างกันผสมอยู่ ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ ทำให้โอกาสที่จะได้โมเลกุลที่มีความยาวโซ่เท่ากัน (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน) นั้นเป็นศูนย์ ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลทั่วไปจึงระบุเป็นค่าเฉลี่ย และเนื่องจากพอลิเมอร์เป็นสารพอลิดิสเพอร์ส ดังนั้นจึงระบุค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล (polydispersity) (M_w / M_n) เพื่อบอกถึงค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลด้วย ซึ่งสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพียงค่าเดียวจะมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1 (ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2527) เมื่อนำพอลิเมอร์ของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52, *Proteus mirabilis* SM 13 และ *Bacillus subtilis* SM 29 มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลด้วย Gel Permeation Chromatography น้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีค่าเท่ากับ 5.8 x 10^4, 6.4 x 10^4 และ 5.9 x 10^4 ดาลตัน ตามลำดับ ส่วนค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 2.8, 3.1 และ 3.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ซึ่งค่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เคยมี

ตารางที่ 14 ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม / 100 กรัมตัวอย่าง)		
	Proteus mirabilis SM 13	*Bacillus subtilis* SM 52	*Bacillus subtilis* SM 52
ASP (กรดแอสปาร์ติค)	36.27	32.48	27.58
SER (เซรีน)	11.44	16.19	7.81
GLU (กรดกลูตามิก)	14,512.06	10,909.44	12,639.17
GLY (ไกลซีน)	18.93	29.51	14.26
HIS (ฮิสติดีน)	0	0	0
ARG (อาร์จินีน)	23.95	23.45	20.13
THR (ธรีโอนีน)	14.81	17.70	13.83
ALA (อะลานีน)	16.10	62.41	10.55
PRO (โปรลีน)	44.53	38.48	28.78
CYS (ซีสเตอีน)	17.69	50.01	8.87
TYR (ไทโรซีน)	13.05	15.86	6.80
VAL (เวลีน)	13.22	14.71	10.35
MET (เมไธโอนีน)	0	0	0
LYS (ไลซีน)	14.42	16.09	11.14
ILE (ไอโซลูซีน)	9.77	7.59	7.91
LEU (ลูซีน)	11.41	8.63	9.12
PHE (เฟนิลอะลานีน)	10.90	13.90	8.45

ตารางที่ 15 น้ำหนักโมเลกุล และการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

การวิเคราะห์	พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์		
	Proteus mirabilis SM 13	*Bacillus subtilis* SM 29	*Bacillus subtilis* SM 52
น้ำหนักโมเลกุล (M_w) (Dalton)	6.4×10^4	5.9×10^4	5.8×10^4
การแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล (M_w / M_n)	3.1	3.3	2.8
ผลพลอยได้[a] (by-product)	$M_w < 1,000$	$M_w < 1,000$	$M_w < 1,000$

[a] เป็นค่าที่วัดได้จากการต่อ calibration curve

การศึกษามาก่อนหน้านี้ (ประมาณ 5-10 เท่า) โดยมีรายงานว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิด (PGA) จาก *Bacillus subtilis* IFO 3335 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 266,000 – 4,110,000 ดาลตัน และมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 2.8 – 10.5 (Goto and Kunioka, 1992) ในขณะที่ PGA ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TAM-4 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 560,000 – 1,683,000 ดาลตัน และมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.7 – 12.3 (Ito *et al.*, 1996) ซึ่งค่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีค่าสูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่แยกได้ประมาณ 10 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ *B. subtilis* IFO 3335 และ *B. subtilis* TAM - 4 ได้ผ่านการศึกษาถึงสภาวะและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์แล้ว ซึ่งจากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อน้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล ใน *Bacillus subtilis* TAM-4 และ *Bacillus subtilis* IFO 3335 พบว่าให้ผลที่แตกต่างกัน โดยน้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของ *B. subtilis* TAM-4 จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของ *B. subtilis* IFO 3335 จะเพิ่มขึ้นในช่วง 47 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นน้ำหนักโมเลกุลจะลดลง ซึ่งสันนิษฐานว่า *B. subtilis* IFO 3335 สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยพอลิเมอร์ ทำให้สายโซ่ของพอลิเมอร์สั้นลง ดังนั้นเวลาในการเลี้ยงเชื้อจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้

น้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล เป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 10^6 ถึง 8×10^6 ดาลตัน และ 2 – 5 ตามลำดับ (Camero *et al.*, 1998) ค่าน้ำหนักโมเลกุลเป็นค่าที่บอกถึงขนาดของพอลิเมอร์ ส่วนค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลเป็นค่าที่แสดงถึงการกระจายตัวของโมเลกุลในสายโซ่ของพอลิเมอร์ (Campbell and White, 1989) เนื่องจากพอลิเมอร์เกิดจากโมโนเมอร์ หรือโอลิกอเมอร์หลาย ๆ โมเลกุลมาต่อกัน ดังนั้นพอลิเมอร์จะมีการกระจายของความยาวสายโซ่ในโมเลกุล (chain length) ซึ่งมีผลมาจากกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่นในการเกิดพอลิเมอร์ ดังนั้นค่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ของค่าที่วัดได้จึงรายงานเป็นค่าเฉลี่ย (Odian, 1991)

2.4 คุณสมบัติในการตกตะกอนของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ นำมาศึกษาคุณสมบัติในการตกตะกอน พบว่าพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 และ *Bacillus subtilis* SM 29 ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอน (flocculating activity) ที่ใกล้เคียงกัน (0.198 และ 0.205 ตามลำดับ) ซึ่งค่าที่ได้สูงกว่าค่ากิจกรรมการ ตกตะกอนจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 (0.075) ประมาณ 2.5 เท่า (ตารางที่ 16) อย่างไรก็ตาม ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้นี้มีค่าต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่เคยมีการศึกษาโดยใช้พอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ เช่น พอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 15 (Yokoi *et al.*, 1995) พอลิเมอร์ชนิดโปรตีนที่ผลิตจากเชื้อ *Rhodococcus etythropolis* ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 33 (Takeda *et al.*, 1991) และพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *Enterobacter* sp. ซึ่งให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 125 (Yokoi *et al.*, 1997) เมื่อใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในระดับเดียวกัน (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) การใช้น้ำหมักจะให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงกว่าการใช้พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาก โดยค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้จากการใช้น้ำหมักให้ค่าอยู่ในช่วง 4.6 - 9.5 ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำหมักมีความเข้มข้นของพอลิเมอร์สูง (สูงกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพราะยังไม่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ นอกเหนือจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้ว พบว่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ชนิดของไอออนบวก และความเข้มข้นของไอออนบวกที่ใช้ในการตกตะกอน พีเอช และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาในการตกตะกอน ต่างมีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอนเช่นเดียวกัน (Dermlim, 1999) จากรายงานของ Suh และคณะ (1997) และการรายงานของ Kwon และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการตกตะกอนโดยใช้พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ตามลำดับ พบว่าการใช้พอลิเมอร์ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนได้ โดยค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้มีค่าเท่ากับ 43 และ 50 ตามลำดับ แสดงว่าพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการเป็นสารตกตะกอนแต่ต้องใช้ความเข้มข้นสูง

ตารางที่ 16 คุณสมบัติในการตกตะกอนของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการใช้น้ำหมัก (เลี้ยงเชื้อที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน)

ตัวอย่าง	น้ำหมัก		พอลิเมอร์ (20 มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	กิจกรรมการตกตะกอน	อัตราการตกตะกอน (%)	กิจกรรมการตกตะกอน	อัตราการตกตะกอน (%)
Proteus mirabilis SM 13	4.625	74.62	0.198	15.63
Bacillus subtilis SM 29	8.398	94.29	0.205	16.06
Bacillus subtilis SM 52	9.506	90.69	0.075	6.53

ประเภทของพอลิเมอร์ จุลินทรีย์ที่ผลิตพอลิเมอร์ และความเข้มข้นของพอลิเมอร์มีผลต่อกิจกรรมการตกตะกอน พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรดจะให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่สูงกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Enterobacter* sp. ผลิตพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรด ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 125 เมื่อใช้ความ เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yokoi *et al.*, 1997) ในขณะที่พอลิเมอร์ประเภทอื่น เช่น พอลิเมอร์ประเภทพอลิกลูตามิกแอซิด (PGA) จาก *Bacillus subtilis* (Yokoi *et al.*, 1996) และ พอลิเมอร์ประเภทโปรตีนจาก *Rhodococcus etythropolis* (Takeda *et al.*, 1991) ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 20 และ 33 ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในระดับเดียวกัน จากรายงานดังกล่าวจะเห็นว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรดให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่สูงกว่าการใช้พอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดประมาณ 4 เท่า แสดงว่าองค์ประกอบและโครงสร้างของโมเลกุลภายในของพอลิเมอร์ เช่น ประจุรวมของโมเลกุล (total charge) หมู่ฟังก์ชันในโมเลกุล มีผลต่อการตกตะกอนของพอลิเมอร์ นอกจากนี้ในกลุ่มของพอลิแซคคาไรด์ด้วยกัน พบว่าพอลิแซคคาไรด์จาก *Enterobacter* sp. ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่สูงกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ โดยค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 105-125 (Dermlim, 1999 ; Yokoi *et al.*, 1997) ในขณะที่พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่ผลิตพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรดเช่นเดียวกันให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนในระดับที่ต่ำกว่า เช่น *Bacillus* sp. (Suh *et al.*, 1997), *Pestalotiopsis* sp. (Kwon *et al.*, 1996) และ *Zoogloea ramigera* (Suh *et al.*, 1997) ซึ่งมีค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 43, 50 และ 15 ตามลำดับ แสดงว่าคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุล) มีผลต่อกลไกการตกตะกอนของพอลิเมอร์ (Gregory, 1987) ตัวอย่างเช่น พอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. และ *Enterobacter* sp. มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูงมาก (ใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้นต่ำแต่ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่สูง) จากการที่น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ (2×10^6 และ 2.5×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ) มีค่าสูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จากเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองนี้ (ประมาณ 58,000 – 64,000 ดาลตัน) จึงอาจมีผลทำให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้จากพอลิเมอร์ที่แยกได้มีค่าต่ำมาก

2.5 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

การทดสอบความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52, *Bacillus subtilis* SM 29และ *Proteus mirabilis* SM 13 ในตัวทำละลาย 12 ชนิด (ตารางที่ 17) พบว่าพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ (เอทานอล อะซิโตน เมทานอล เฮกซาดีเคน ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน ไอโซออกเทน เบนซีน อะซิโตไนไตรล์ และ เอทิลอะซิเตท) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตและหลั่งสารพอลิเมอร์ชนิดที่ละลายได้ในน้ำออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดมีคุณสมบัติที่สามารถละลายได้ในน้ำ (Goto and Kunioka, 1992 ; Ito *et al.*, 1996 ; Camero *et al.*, 1998) นอกจากนี้ผลจากการที่พอลิเมอร์จากเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการตกตะกอนพอลิเมอร์เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

3. การเปรียบเทียบการเจริญ และการผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน

การเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการใช้กรดกลูตามิกทางการค้า (ภาพที่ 7) โดยพิจารณาจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.628 และ 1.395 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากการเลี้ยงเชื้อนาน 2 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเจริญในกรดกลูตามิกทางการค้ามีค่าสูงกว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเจริญในกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ประมาณ 2 เท่า การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรมีค่าลดลง โดยค่าพีเอชลดลงจากค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.82 และ 6.84 ตามลำดับ ไปเป็น 5.87 และ 5.80 ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 5 วัน ผลผลิตพอลิเมอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และอาหารเลี้ยง

ตารางที่ 17 คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ตัวทำละลาย	พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์		
	Proteus mirabilis SM 13	*Bacillus subtilis* SM 29	*Bacillus subtilis* SM 52
น้ำกลั่น	+	+	+
เอทานอล	-	-	-
อะซิโตน	-	-	-
เมทานอล	-	-	-
เฮกซาดีเคน	-	-	-
ปิโตรเลียมอีเทอร์	-	-	-
คลอโรฟอร์ม	-	-	-
เฮกเซน	-	-	-
ไอโซออกเทน	-	-	-
เบนซีน	-	-	-
อะซิโตไนไตร์ล	-	-	-
เอทิลอะซิเตท	-	-	-

หมายเหตุ + แทน ละลาย

- แทน ไม่ละลาย

เชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า เท่ากับ 41.55 และ 31.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 18) หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 2 วัน

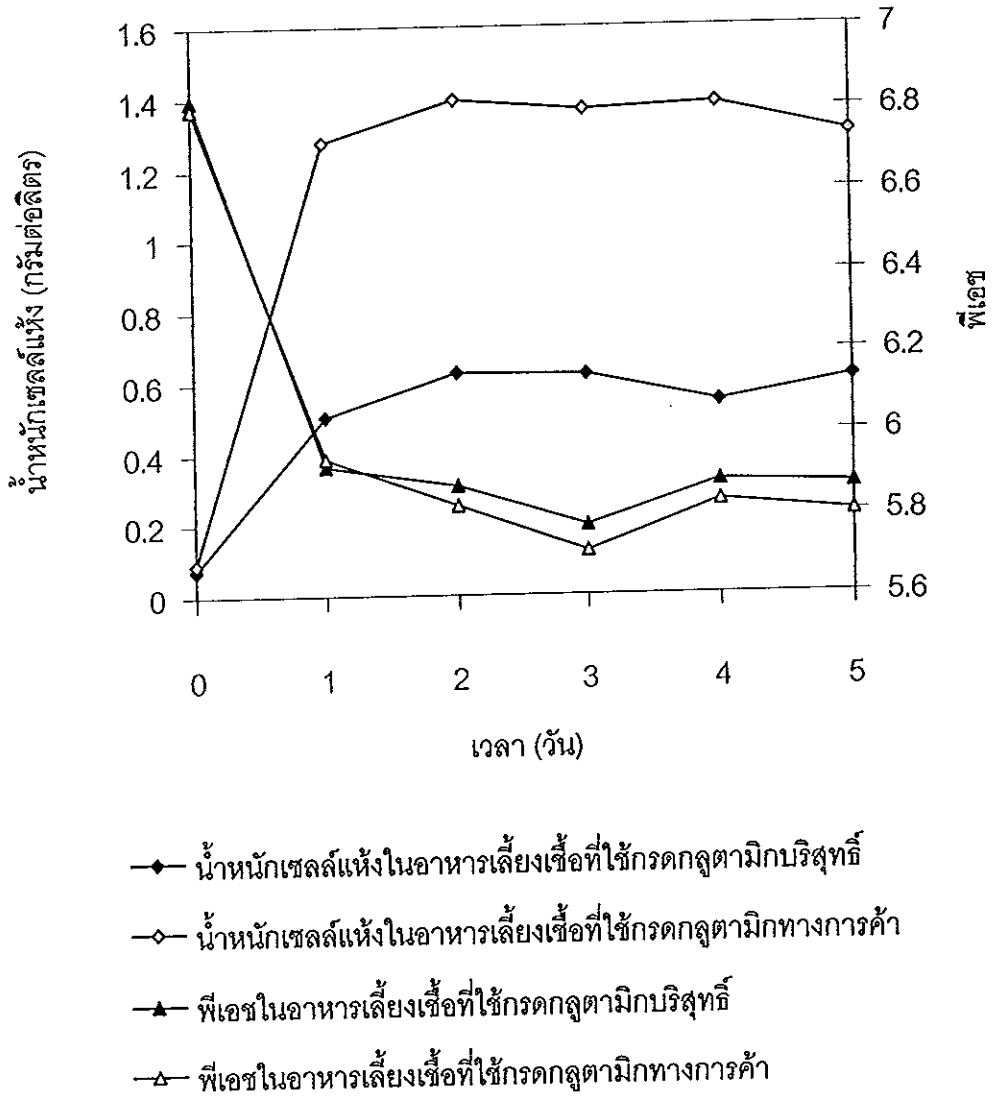
การเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 29 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับการใช้กรดกลูตามิกทางการค้า (ภาพที่ 8) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 29 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.488 และ 0.760 กรัมต่อลิตร ตามลำดับหลังจากการเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน จะเห็นได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้าสูงกว่าการใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ประมาณ 1.5 เท่า การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรมีค่าลดลง โดยค่า พีเอชลดลงจากค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.91 และ 6.83 ตามลำดับ ไปเป็น 5.75 และ 5.63 ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 5 วัน ผลผลิตพอลิเมอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า เท่ากับ 48.10 และ 34.35 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 18) ตามลำดับ

การเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับการใช้กรดกลูตามิกทางการค้า (ภาพที่ 9) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.538 และ 0.665 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 1 วัน ซึ่งค่าที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดใกล้เคียงกัน แสดงว่าเชื้อสามารถใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าได้ดีพอ ๆ กัน การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรมีค่าลดลง โดยค่าพีเอชลดลงจากค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.97 และ 6.93 ตามลำดับ ไปเป็น 5.96 และ 5.76 ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 5 วัน ผลผลิตพอลิเมอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า เท่ากับ 46.27 และ 39.18 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 18) ตามลำดับ

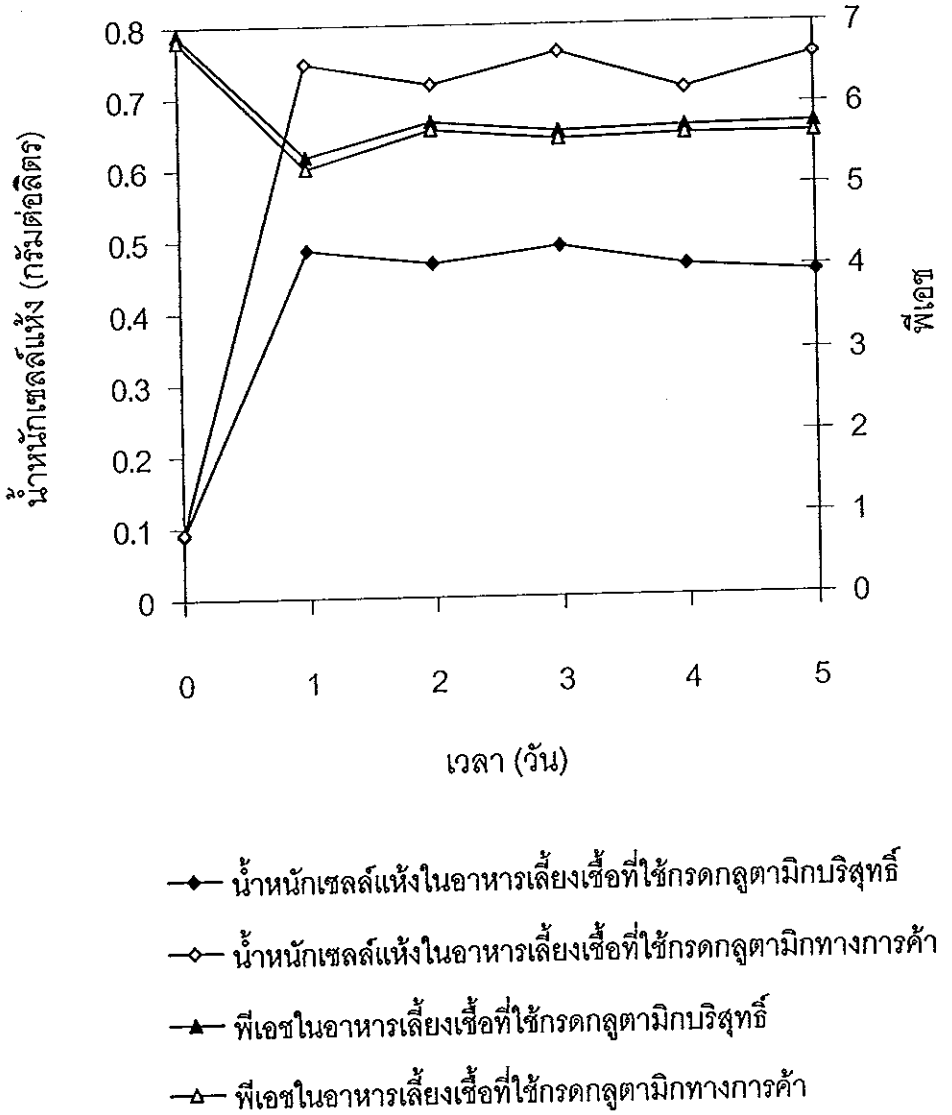
จากการที่จุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถใช้กรดกลูตามิกทางการค้า (ในรูปของเกลือโซเดียม) ในการเจริญได้ดีเท่าหรือดีกว่าการใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ นับเป็นผลดีในการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากกรดกลูตามิกทางการค้ามีราคาถูกกว่ากรดกลูตามิกบริสุทธิ์มาก สำหรับการนำกรดกลูตามิกในรูปเกลือโซเดียมมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิกลูตามิกแอซิด ได้มีรายงานการใช้กับเชื้อ *Bacillus subtilis* (natto) (Hara and Ueda, 1982), *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* (Kanegae *et al.*, 1993)

ตารางที่ 18 ผลผลิตพอลิเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

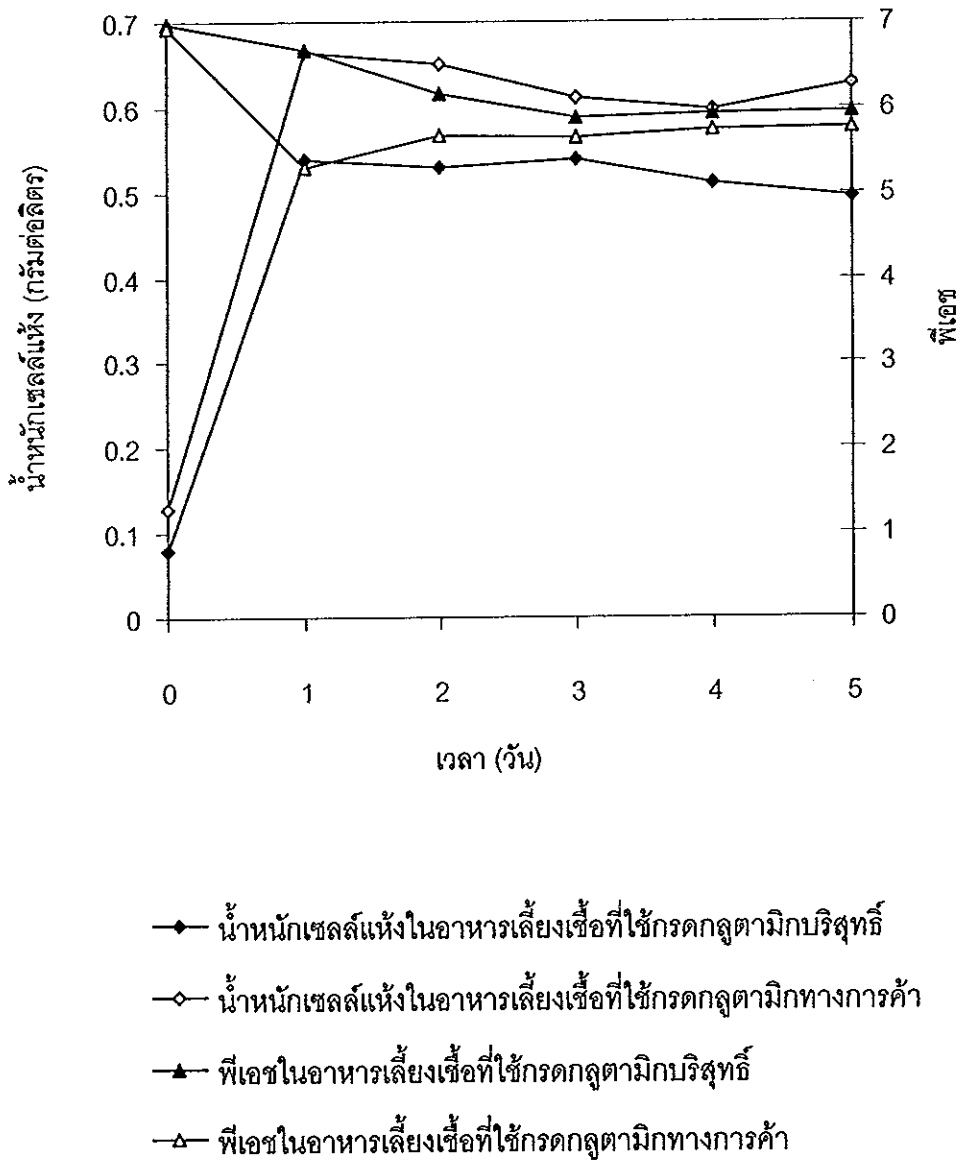
สายพันธุ์จุลินทรีย์	ผลผลิตพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร)	
	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า
Proteus mirabilis SM 13	46.27	39.18
Bacillus subtilis SM 29	48.10	34.35
Bacillus subtilis SM 52	41.55	31.45



ภาพที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอชของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอชของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 29 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอชของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และกรดกลูตามิกทางการค้า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้าและกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ มีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบวนการเมทาบอลิซึมของเชื้อทำให้เกิดการสะสมของกรดหลายชนิดที่เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ ได้แก่ กรดซิตริก กรดไอโซซิตริก กรดมาลิก กรดฟูมาริก และกรดซัคซินิค เป็นต้น

3.2 คุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์และกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน

นำพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ และการใช้กรดกลูตามิกทางการค้า มาศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 19) พบว่าคุณสมบัติของพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ผลการทดลองบางประการที่แตกต่างกัน ได้แก่ ปริมาณไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 29 เมื่อใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าสูงกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยใช้กรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน โดยค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 5.46 และ 3.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 ปริมาณไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าต่ำกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยใช้กรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน โดยค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 4.22 และ 5.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในจุลินทรีย์ สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 ปริมาณไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าใกล้เคียงกันกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยใช้กรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน โดยค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 5.44 และ 5.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คุณสมบัติในการใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (bioflocculant) ในกรณีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน พอลิเมอร์ที่ได้ไม่แสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพเมื่อใช้พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อทดลองใช้น้ำหมัก (ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร) แทนการใช้พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ พบว่าน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 และ *Bacillus subtilis* SM 29 ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 0.30 และ 0.07 ตามลำดับ และมีอัตรา

ตารางที่ 19 คุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับการใช้กรดกลูตามิกทางการค้า เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติ	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์			อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า		
	Proteus mirabilis SM 13	*Bacillus subtilis* SM 29	*Bacillus subtilis* SM 52	*Proteus mirabilis* SM 13	*Bacillus subtilis* SM 29	*Bacillus subtilis* SM 52
องค์ประกอบ						
- กลุ่มอัลฟ่าอะมิโน	+	+	+	+	+	+
- กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก	-	-	-	-	-	-
- คาร์บอน (% โดยน้ำหนัก)	30.75	30.99	30.97	30.47	31.10	30.75
- ไนโตรเจน (% โดยน้ำหนัก)	6.08	5.42	5.42	6.01	5.49	5.48
- ไฮโดรเจน (% โดยน้ำหนัก)	4.22	5.46	5.44	5.84	3.28	5.98
- ซัลเฟอร์ (% โดยน้ำหนัก)	0	0	0	0	0	0
- ออกซิเจน (% โดยน้ำหนัก)	48.24	52.71	48.73	44.19	49.56	44.95
- น้ำตาลทั้งหมด (% โดยน้ำหนัก)	12.99	13.27	9.48	9.95	8.36	12.61
คุณสมบัติการละลาย						
- น้ำ	+	+	+	+	+	+
- ตัวทำละลายอินทรีย์ (11 ชนิด)*	-	-	-	-	-	-
น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	$6.4x10^4$	$5.9x10^4$	$5.8x10^4$	$6.2x10^4$	$6.3x10^4$	$5.8x10^4$
การแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล (polydispersity)	3.1	3.3	2.8	2.6	2.6	2.7
กิจกรรมการตกตะกอน[B]	4.62	8.40	9.51	0	0.07	0.30
อัตราการตกตะกอน[B] (%)	74.62	94.29	90.69	0	7.94	25.48
กิจกรรมการตกตะกอน[P]	0.20	0.21	0.08	ND	ND	ND
อัตราการตกตะกอน (%)[P]	16.06	15.63	6.53	ND	ND	ND

B แทน น้ำหนัก P แทน พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ND แทน not determine

* ได้แก่ เอทานอล, เมทานอล, อะซิโตน, เฮกซาดีเคน, ปิโตรเลียมอีเทอร์, คลอโรฟอร์ม, เฮกเซน, ไอโซออกเทน, เบนซีน, อะซิโตไนไตร์ล และ เอทิลอะซิเตท

การตกตะกอนเท่ากับ 25.48 และ 7.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ผลการทดลองที่ได้จากการใช้น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอน และอัตราการตกตะกอนเท่ากับศูนย์

จากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพอลิเมอร์ มีผลต่อคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารที่นำมาใช้

3.3 การคัดเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการตกตะกอนพอลิเมอร์

ทดลองใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล และเอทานอล ในการตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมักของจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้ 3 สายพันธุ์ หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 2 วัน (ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์เป็นองค์ประกอบ) ผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 20) พบว่าอะซิโตนสามารถตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52, *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Proteus mirabilis* SM 13 ได้ 41.55, 48.10 และ 46.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เอทานอลสามารถ ตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมักของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวได้ 28.90, 31.43 และ 29.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมทานอลสามารถตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมักของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 และ *Bacillus subtilis* SM 29 ได้ 0.700 และ 0.570 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมักของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Proteus mirabilis* SM 13 การใช้อะซิโตนในการตกตะกอนพอลิเมอร์ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้สูงกว่าการใช้เอทานอลในการตกตะกอนประมาณ 1.5 เท่า และสูงกว่าการใช้เมทานอลในการตกตะกอนประมาณ 70 เท่า ส่วนการใช้เอทานอลในการตกตะกอนพอลิเมอร์ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่ได้สูงกว่าการใช้เมทานอลในการตกตะกอนประมาณ 50 เท่า

จากการศึกษาที่ผ่านมา ในการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์ออกจากน้ำหมัก ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอทานอล (Kubota *et al* ., 1993 ; Yokoi *et al* ., 1996 ; Ito *et al* ., 1996) , เมทานอล (Goto and Kunioka, 1996) และ อะซิโตน (Kurane *et al* ., 1994 ; Lee *et al* ., 1995) ในการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์ออกจากน้ำหมักอาศัยคุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์ การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจะพิจารณาจากค่า polarity ของโมเลกุลของ

ตารางที่ 20 ผลผลิตพอลิเมอร์ที่ได้จากการตกตะกอนโดยใช้ตัวทำลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ผลผลิตพอลิเมอร์ (กรัมต่อลิตร)					
	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์			อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า		
	อะซิโตน	เอทานอล	เมทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	เมทานอล
Proteus mirabilis SM 13	46.27	29.75	0	39.18	18.79	0
Bacillus subtilis SM 29	48.10	31.43	0.33	34.35	19.94	0.32
Bacillus subtilis SM 52	41.55	28.92	0.700	31.45	24.94	0.570

สาร โดยพิจารณาได้จากค่า dielectric constant (สมใจ ศิริโภค, 2537) จากผลการทดลอง พบว่า พอลิเมอร์สามารถตกตะกอนในอะซิโตนได้ในปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือเอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า dielectric constant พบว่า อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล มีค่า dielectric constant เท่ากับ 20.7, 24.3 และ 32.6 ตามลำดับ (สมใจ ศิริโภค, 2537) อะซิโตนมีความเป็นโพลาร์ต่ำที่สุด จึงสามารถตกตะกอนเมอร์ได้ในปริมาณมากที่สุด

ในการเก็บเกี่ยวและการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ เป็นขั้นตอนที่เสียค่าใช้จ่ายประมาณ 20 – 60 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนทั้งหมด ในทางทฤษฎีการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากกระบวนการหมักและการทำให้บริสุทธิ์ ควรเลือกใช้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ให้ผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้สูง ใช้เครื่องมือที่เหมาะสมทั้งชนิดและขนาดเพื่อให้ค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด แต่ควรจะพิจารณาปัจจัยอื่นร่วมด้วย ได้แก่ ตำแหน่งของผลิตภัณฑ์อยู่ภายในหรือภายนอกเซลล์, คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของผลผลิตที่ต้องการ, วัตถุประสงค์ของการนำผลิตภัณฑ์ไปประยุกต์ใช้ และราคาของผลิตภัณฑ์ในตลาด (สมใจ ศิริโภค, 2537) ดังนั้น การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในกระบวนการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากน้ำหมัก และการทำบริสุทธิ์จึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง

3.4 คุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของพอลิเมอร์เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอน

นำพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมัก ได้แก่ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล มาศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 21) พบว่าคุณสมบัติของพอลิเมอร์จากเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ผลการทดลองบางประการที่แตกต่างกันเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์จากน้ำหมัก ได้แก่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 52 เมื่อใช้เอทานอลในการตกตะกอนมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ พอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้อะซิโตนและเมทานอลในการตกตะกอน ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 15.74, 9.48 และ 7.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

ตารางที่ 21 คุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันในการตกตะกอน เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติ	การตกตะกอนโดยใช้อะซิโตน			การตกตะกอนโดยใช้เอทานอล			การตกตะกอนโดยใช้เมทานอล	
	SM 13	SM 29	SM 52	SM 13	SM 29	SM 52	SM 29	SM 52
องค์ประกอบ								
- กลุ่มอัลฟาอะมิโน	+	+	+	+	+	+	+	+
- กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก	-	-	-	-	-	-	-	-
- น้ำตาลทั้งหมด (% โดยน้ำหนัก)	12.99	13.27	9.48	14.43	15.93	15.74	14.29	7.71
คุณสมบัติการละลาย								
- น้ำ	+	+	+	+	+	+	+	+
- ตัวทำละลายอินทรีย์[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
- น้ำหนักโมเลกุล	6.4×10^4	5.9×10^4	5.8×10^4	5.7×10^4	6.3×10^4	6.7×10^4	< 1,000	< 1,000
- การแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล (polydispersity)	3.1	3.3	2.8	2.6	2.6	2.7	0	0
- กิจกรรมการตกตะกอน	0.20	0.21	0.08	0	0	0	0.284	0.323
- อัตราการตกตะกอน (%)	15.63	16.06	6.53	0		0	17.07	18.48

[a] ได้แก่ เอทานอล เมทานอล อะซิโตน เฮกซาดีเคน ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน ไอโซออกเทน เบนซีน อะซิโตไนไตร์ล และ เอทิลอะซิเตท

สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Proteus mirabilis* SM 13 ปริมาณ น้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดในการตกตะกอนพอลิเมอร์มีค่าใกล้เคียงกัน

น้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อใช้อะซิโตนและเอทานอลในการตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากหมักมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 57,000 ถึง 67,000 ดาลตัน และมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5 ถึง 3.3 แต่เมื่อใช้เมทานอลในการตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากน้ำหมัก ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีค่าต่ำมาก (น้อยกว่า 1,000 ดาลตัน) เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด มีความสามารถในการตกตะกอนพอลิเมอร์ได้น้ำหนักโมเลกุลในช่วงที่แตกต่างกัน

คุณสมบัติในการเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (bioflocculant) ในกรณีที่ใช้เอทานอลในการตกตะกอนพอลิเมอร์ พอลิเมอร์ที่ได้ไม่แสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ แต่ทั้งนี้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนและอัตราการตกตะกอนที่ได้จากการใช้อะซิโตนและเมทานอลในการตกตะกอนพอลิเมอร์ ก็มีค่าไม่สูงเช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าการใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากน้ำหมัก มีผลต่อองค์ประกอบบางประการของพอลิเมอร์

บทที่ 4

สรุป

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล โรงงานผลิตน้ำยางข้น และจากแหล่งอื่น ๆ ได้เชื้อรวม 54 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ อาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อที่ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลีกลูตามิกแอซิด (PGA จำนวน 42 สายพันธุ์) ชนิดไกลโคโปรตีน (GP จำนวน 1 สายพันธุ์) ชนิดพอลีแซคคาไรด์ (PS จำนวน 4 สายพันธุ์) ชนิดโปรตีน (PR จำนวน 3 สายพันธุ์) ชนิดไกลโคลิปิด (GL จำนวน 4 สายพันธุ์) และชนิดพอลีไลซีน (PL) ซึ่งไม่พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดพอลีไลซีน คัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง และให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SM 13, SM 29 และ SM 52 เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จำแนกได้เป็น *Proteus mirabilis* SM 13 , *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Bacillus subtilis*. SM 52 ตามลำดับ

2. พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วยหมู่อัลฟาอะมิโน น้ำตาล แร่ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน ในโมเลกุล และภายในโมเลกุลประกอบด้วยกรดกลูตามิกประมาณร้อยละ 98 ของกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 58,000 - 64,000 ดาลตัน พอลิเมอร์ที่ได้สามารถละลายได้ง่ายในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีคุณสมบัติในการใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพได้ เมื่อทดสอบการตกตะกอนในสารละลายแขวนลอยของ kaolin

3. แบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถใช้กรดกลูตามิกทางการค้า (monosodium glutamate) แทนการใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ (L-glutamic acid) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกทางการค้า ให้ผลการทดลองบางประการที่แตกต่างจากค่าที่ได้จากการพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดกลูตามิกบริสุทธิ์ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และคุณสมบัติในการเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ โดยพอลิเมอร์ที่ผลิต

ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกทางการค้า ไม่มีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ

4. การใช้อะซิโตนในการตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากน้ำหมัก ให้ผลผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณสูงกว่าการใช้เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ และยังพบว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกันในการตกตะกอนพอลิเมอร์มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีบางประการของพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานวิจัยเกี่ยวกับพอลิเมอร์ชีวภาพจากแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ในประเด็นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่แยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่
   2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิเมอร์
   2.2 การลดต้นทุนในการผลิต โดยการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก ตลอดจนการลดต้นทุนในการเก็บเกี่ยว และการทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์ เช่น แนวทางและความเป็นไปได้ของการนำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการตกตะกอนมาใช้ใหม่ (reuse) หรือการทดลองหาวิธีการใหม่ ๆ ในการทำบริสุทธิ์พอลิเมอร์เพื่อให้ได้พอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ และมีคุณภาพในการนำไปใช้งานเพิ่มมากขึ้น
3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำพอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านการแพทย์
4. ความสามารถในการย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพของพอลิเมอร์ และแนวโน้มการนำพอลิเมอร์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น

เอกสารอ้างอิง

ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์. 2526. บทนำ : แนวคิดพื้นฐาน. ใน โพลิเมอร์เชิงพาณิชย์. หน้า. 1-80. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ประหยัด โกมารทัต, ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม และ ภิญโญ พานิชพันธ์. 2530. กรดอะมิโนและโปรตีน. ใน ชีวเคมี. (มนตรี จุฬาวัฒนทล, บรรณาธิการ). ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วีรพันธุ์ เดิมหลิ่ม และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2540. สารตกตะกอนชีวภาพจากจุลินทรีย์. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 19 : 239 - 254.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. สหมิตรออฟเซท. กรุงเทพฯ.

Aragno, M. 1992. Aerobic, chemolithoautotrophic, thermophilic bacteria. *In* Thermophilic Bacteria. (Kristjansson, J.K. ed). p. 77-104. CRC Press. Florida.

Badr-Eldin, S.M., Dldin, S.M., El-Tayeb, O.M., El-Masry., H.G., Mohamad, F.H.A. and Abol El-Rahman, O.A. 1994. Polysaccharides production by *Aureobasidium pullulans* : factor affecting polysacchardie formation. World. J. Microbiol. Biotechnol. 10 (4) : 423-426.

Bitton, G. 1994. Activated sludge process. *In* Wastewater Microbiology. (Mitchell, R. ed). p. 147-168. John Wiley & Sons. New York.

Brock, T.D. 1986. Introduction : an overview of the thermophile. *In* Thermophiles. (Brock, T.D. ed). p. 1-16. John Wiley & Sons. New York.

Brock, T.D. and Modigan, M.T. 1991. Growth and its control. *In* Biology of Microorganisms. 6th ed. p. 321-327. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey.

Camero, G.P., Congregado, F., Bou, J.J. and Guerra, S.M. 1998. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly (γ - glutamic acid). Biotechnol. Bioeng. 63 (1) : 110-115.

Campbell, D. and White, J.R. 1989. Molecular weight determination. *In* Polymer Characterization : Physical Techniques. Chapman and Hall. London.

Cheng, C., Asada, Y. and Aida, T. 1989. Production of γ-polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. Agric. Biol. Chem. 53(9) : 2369-2375.

Collins, E.A., Bares, J. and Billmeyer, F.W. 1973. Experiments in Polymer Science. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Dermlim, W. 1999. Screening for Polymer-Producing Bacteria from Seafood Activated Sludge and Bioflocculant Characterization. Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.

Dermlim, W., Prasertsan, P. and Doelle, H. 1999. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 : 698-703.

Dlamini, A.M. and Peiris, P.S. 1997. Biopolymer production by a *Klebsiella oxytoca* isolate using whey as fermentation substrate. Biotech. Lett. 19 (2) : 127-130.

Dubois, M., Gilles, K.M., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 (3) : 350-356.

Gregory, J. 1987. Kinetics aspects of polymers adsorption and flocculation. *In* Flocculation in Biotechnology and Seperation System. (Attia, Y.A. ed.). p. 31-43. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

Goto, A. and Kunioka, M. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ - glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. Biosci. Biotech. Biochem. 56 (7) : 1031-1035.

Hara, T. and Ueda, S. 1982. Regulation of polyglutamate production in *Bacillus subtilis (natto)* : transformation of high PGA productivity. Agric. Biol. Chem. 46 (9) : 2275-2281.

Henis, Y. 1987. Survival and domancy of bacteria. *In* Survival and Domancy of Microorganisms. (Henis, Y. ed). p. 13-18. John Wiley & Sons. New York.

Hoste, K., Schacht, E. and Seymour, L. 2000. New derivatives of polyglutamic acid as drug carrier systerm. J. Controlled Release. 9 (64) : 53-61.

Ito, Y., Tanaka, T., Ohmachi, T. and Asada, Y. 1996. Glutamic acid independent production of poly (γ - glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. Biosci. Biotech. Biochem. 60 (8) : 1239-1242.

Kanagae, Y., Sugiyama, Y. and Nakatsui, T. 1993. Method for producing polyglutamic acid or a salt thereof. US Patent 5,268,279.

Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satho, A., Tanaka, T. and Taniguchi, M. 1993. Production of poly (γ - glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. Biosci. Biotech. Biochem. 57 (7) : 1212-1213.

Kunioka, M. 1995. Biosynthesis of poly (γ-glutamic acid) from L-glutamate, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 : 501-506.

Kunioka, M. 1997. Biosynthesis and chemical reactons of poly (amino acid)s from microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47 : 469-475.

Kurane, R., Toeda, K., Takeda, K. and Suzuki, T. 1986. Culture conditons for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. Agric. Biol. Chem. 50 (9) : 2309-2313.

Kurane, R. and Nohata, Y. 1994. A new water-absorbing polysaccharide from *Alcaligenes latus*. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (2) : 235-238.

Kurane, R., Hatamochi, K., Kukuno, T., Kiyohara, M., Hirano, M. and Taniguchi, Y. 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (2) : 428-429.

Kurane, R., Hatamochi, K., Kukuno, T., Kiyohara, M., Kawaguchi, K., Mizuno, Y., Hirano, M. and Taniguchi, Y. 1994. Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (11) : 1977-1982.

Kurane, R. and Mita, H. 1996. Simple and cost-effective procedure for purification of biopolymer from highly viscous *Alcaligenes latus* culture broth. J. Ferment. Bioeng. 81 (1) : 90-92.

Kwon, G.S., Moon, S.H., Hong, S.D. Lee, H.M., Kim, H.S., Oh, H.M. and Yoon, B.D. 1996. A novel flocculant biopolymer produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. Biotechnol. Lett. 18 (12) : 1459-1464.

Lee, S.H., Lee, S.O., Jang, K.L. and Lee, T.H. 1995. Microbial flocculant from *Arcuadendron sp.* TS-49. Biotech. Lett. 17 (1) : 95-100.

Magaritis, A. and Pace, G.W. 1985. Microbial polysaccharides. *In* Comprehensive Biotechnology. Vol. 3, The Practice of Biotechnology : Current Commodity Products. (Blanch, H.W., Drew, S. and Wang, D.I.C. eds.). p. 1006-1004. Pergamon Press, Ltd. Oxford.

Matsuyama, H., Sasaki, R., Kawasaki, K. and Yumoto, I. 1999. Production of a novel exopolysaccharide by *Rahnella equatilis*. J. Biosci. Bioeng. 87 (2) : 180-183.

Nohata, Y. and Kurane, R. 1994. Culture conditions for production and purification of bioabsorbent from *Alcaligenes latus* B-16. J. Ferment. Bioeng. 77 (4) : 390-393.

Odian, G. 1991. Introduction. *In* Principles of Polymerization. 3rd ed. p. 19-24. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Peiris, P.S., Dlamini, A.M. and Bavor, H. J. Optimization of bioprocess conditions for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca*. World J. Microbiol. Biotechnol. 14 : 917-919.

Plummer, D.T. 1978. An Introduction to Practical Biochemistry. 2nd ed. McGraw-Hall Book Company (UK) Limited. London.

Sandford, P.A. 1979. A survey of possible new polysaccharides.*In* Polysaccharides in Food. (Blanshard, J.M.V. and Mitchell, J.R. eds.). p. 251-262. Butterworths.

Shima, S. and Sakai, H. 1981a. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies. Agric. Biol. Chem. 45 (11) : 2497-2502.

Shima, S. and Sakai, H. 1981b. Poly-L-lysine produced by *Sterptomyces*. Part III. Chemical studies. Agric. Biol. Chem. 45 (11) : 2503-2508.

Shima, S., Fukuhara, Y. and Sakai, H. 1982. Inactivation of bacteriophage by ε-poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Agric. Biol. Chem. 46 (7) : 1917-1919.

Slepecky, R.A. and Ernest Hemphill, H. 1992. The genus *Bacillus*-nonmedical. *In* The Prokaryotes 2nd ed. A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications Vol II. (Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. amd Schleifer, K.H. eds). p. 1663-1669. Springer-Verlag. New York.

Suh, H.H., Kwon, G.S., Lee, C.H., Kim, S.H. Oh, H.M. and Yoon, B.D. 1997. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. J. Ferment. Bioeng. 84 (2) : 108-112.

Sutherland, I.W. 1990. Introduction and definition. *In* Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. p 1-11. Redwood Press Ltd. Great Britain.

Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. TIBTECH. 16 : 41-46.

Takagi, H. and Kadowaki, K. 1985. Flocculant production by *Paecilomyces* sp. : taxonomic studies and culture condition for production. Agric. Biol. Chem. 49 (11) : 3151-3157.

Takeda, M., Kurane, R., Koizumi, J. and Nakamura, I. 1991. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. Agric. Biol. Chem. 55 (10) : 2663-2664.

Takeda, M. Koizumi, J.I., Matsuoka, H. and Hikuma, M. 1992. Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Norcadia amarea*. J. Ferment. Bioeng. 74 (6) : 408-409.

Tallgren. A.H., Airaksinen, U., Weissenberg, R.V., Ojamo, H., Kuusisto, J. and Leisola, M. 1999. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. Appl. Environ. Microbiol. 65 (2) : 862-864.

Van Den Berg, D.J.C., Robijn, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., Ledeboer, A.M. and Theo Verrips, C. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61 (8) : 2840-2844.

Whistler, R.L. 1969. Polysaccharide. *In* Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Vol. 11. (Mark, H.F., Gaylord, N.G. and Bikales, N.M. eds.). p. 396-424. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Wiegel, J. and Ljungdahl, L.G. 1984. The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 3 (1) : 39-64.

Yokoi, H., Natsuda, O., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1995. Characteristics of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus sp.* PY-90. J. Ferment. Bioeng. 79 (4) : 378-380.

Yokoi, H., Arima, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1996. Flocculation properties of poly (γ - glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. J. Ferment. Bioeng. 82 (1) : 84-87.

Yokoi, H., Yoshida, T., Mori, S., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1997. Biopolymer flocculant produced by and *Enterobacter* sp. Biotechnol. Lett. 19 (6) : 569-573.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์

1. การวิเคราะห์หมู่อัลฟาอะมิโน โดยปฏิกิริยา Ninhydrin (Plummer, 1978)

   วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาหมู่อัลฟาอะมิโน

   สารเคมี

   - สารละลายพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
   - สารละลายกรดอะมิโนมาตรฐานของลิวซีน (L-leucine) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
   - สารละลาย ninhydrin : ละลาย ninhydrin 0.04 กรัม ใน absolute ethanol 20 มิลลิลิตร (เก็บให้พ้นแสง)

   วิธีการ

   1. เติมสารละลายของกรดอะมิโนมาตรฐาน / สารละลายพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
   2. เติมสารละลาย ninhydrin ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
   3. ต้นในน้ำเดือดนาน 2 นาที
   4. สังเกตุการเปลี่ยนสีของสารละลาย ถ้าหากมีองค์ประกอบของหมู่อัลฟาอะมิโน สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน

   การแปลผล

   ผลบวก (ninhydrin positive) : สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงหลังจากต้มในน้ำเดือด

2. การวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก โดยปฏิกิริยา Xanthoproteic (Plummer, 1978)

   วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก

   สารเคมี

   - สารละลายพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
   - สารละลายกรดอะมิโนมาตรฐานของทริปโตแฟน (tryptophan) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- กรดไนตริกเข้มข้น (HNO_3)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3 โมลาร์

วิธีการ

1. เติมสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน / สารละลายพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
2. เติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในน้ำเดือด
3. ทำให้เย็น และสังเกตุการเปลี่ยนแปลงสีในสารละลายกรด
4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสังเกตุการเปลี่ยนสีในสารละลายด่าง

การแปลผล

ผลบวก (xanthoproteic positive) : สีเหลือง ในสภาวะที่เป็นกรด
สีส้ม ในสภาวะที่เป็นด่าง

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยปฏิกิริยา Phenol sulfuric acid (Dubois, *et al.*, 1956)

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

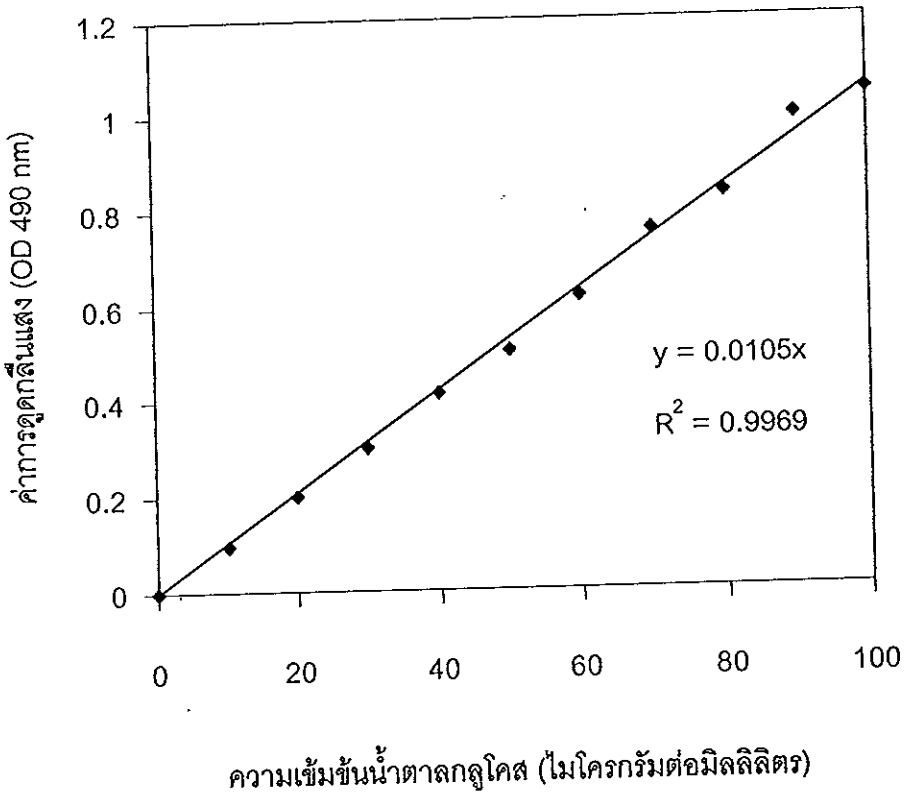
สารเคมี

- สารละลายฟีนอล : ละลายฟีนอลในน้ำ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)
- สารละลายพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

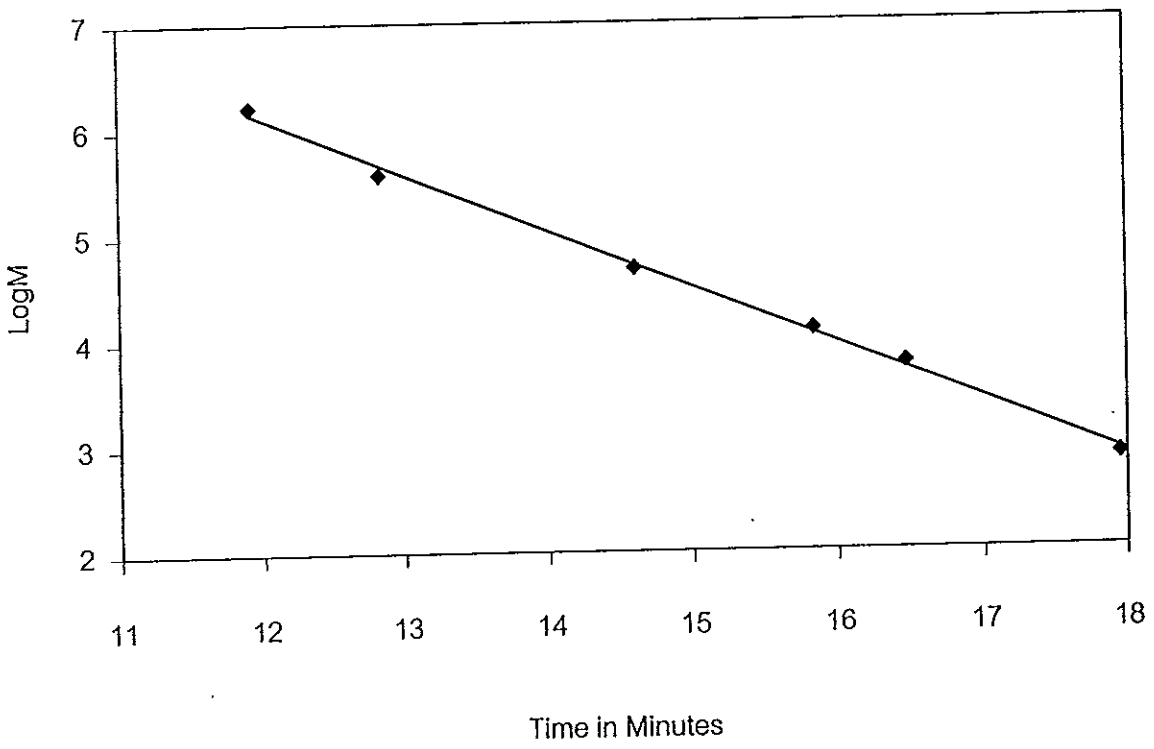
วิธีการ

1. ผสมสารละลายพอลิเมอร์ / สารละลายกลูโคสมาตรฐาน / น้ำ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้กรดสัมผัสกับบริเวณด้านข้างของหลอดทดลอง
3. ปล่อยทิ้งไว้นาน 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากันอย่างแรง

4. ปล่อยทิ้งไว้นาน 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. เตรียมกราฟมาตรฐานปริมาณกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการเดียวกันกับวิธีการข้างต้น



ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



Polynomial Coefficients : LogM = A + BT

A = 1.257465e

B = -5.384383e

ภาพที่ 9 กราฟมาตรฐานพอลลูแลน

ไดอะแกรมแสดงการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* sp. (Slepecky and Hemphill, 1992)

---

1. Catalase : positive.....2

   negative.....17

2. Voges-Proskauer : positive.....3

   negative.....10

3. Growth in anaerobic agar : positive.....4

   negative.....9

4. Growth at 50 °C : positive.....5

   negative.....6

5. Growth in 7% NaCl : positive.....*B. licheniformis*

   negative.....*B. coagulans*

6. Acid and gas from glucose (inorganic N) : positive.....*B. polymyxa*

   negative.....7

7. Reduction of NO_3 to NO_2 : positive.....8

   negative.....*B. alvei*

8. Parasporal body in sporangium : positive..... .*B. thuringiensis*

   negative..... *B. cereus*

9. Hydrolysis of starch : positive.....*B. subtilis*

   negative.....*B. pumilus*

10. Growth at 65 °C : positive.....*B. stearothermophilus*

    negative.....11

11. Hydrolysis of starch : positive.....12

    Negative.....15

12. Acid from gas from glucose (inorganic N) : positive.....*B. macerans*

    negative.....13

13. Width of rod 1.0 µm or greater : positive.....*B. megaterium*

    Negative.....14

14. pH in V-P broth < 6.0 : positive.....*B. circulans*

    negative.....*B. firmus*

15. Growth in anaerobic agar : positive.....*B. laterosporus*

negative.....16

16. Acid from glucose (inorgainic N) : positive.....*B. brevis*

negative.....*B. sphaericus*

17. Growth at 65 °C : positive.....*B. stearothermophilus*

negative.....18

18. Decomposition of casein : positive.....*B. larvae*

negative.....19

19. Parasporal body in sporangium : positive.....*B. popilliase*

negative.....*B. lentimorbus*

ผลงานทางวิชาการ

Presertsan, P., Madla, S. and Methancanon, P. 2000. Characterization of polyglutamic acid produced from thermotolerant bacterial isolates. Paper presented at the International Symposium on the Bioconversion of Renewable Raw Materials : Expo 2000 Hannover. 25-29 September, 2000, German Research Centre for Biotechnology (GBF), Braunschweigh, Germany. Abstract p. 37.

Madla, S., Prasertsan, P. and Methacanon, P. 2000. Screening of thermotolerant polymer producing bacteria and characterization of the polymers. Oral and poster presentation at The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Biotechnology : Impact & Trends". 1-3 November, 2000. Kanchanaburi,Thailand. Abstract p. 41.

Prasertsan, P., Petsuit, M., Kaewchai, S., Madla, S., Ukita, M. and Imai, T. 2000. Biopretreatment of palm oil mill effluent using thermotolerant microorganism. Paper presented at The 2nd Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and their Applications. 21-25 November, 2000. Yamaguchi, Japan. Abstract p. 50.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวศิริพร หมาดหล้า

วัน เดือน ปีเกิด 17 ธันวาคม 2517

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาสำหรับนักศึกษาที่มีผลการเรียนดีเด่น บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ระหว่างปีการศึกษา 2541-2542