

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์
และลักษณะสมบัติของไบโอพอลิเมอร์



นางสาวสายทิพย์ เรืองมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 2 5 0 4 7 2 3

ISOLATION OF BIOPOLYMER-PRODUCING BACTERIA
AND CHARACTERIZATION OF THE BIOPOLYMER



Miss Saitip Ruangma

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

512069

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์และลักษณะสมบัติของไบโอพอลิเมอร์
โดย	นางสาวสายทิพย์ เรืองมา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน
.....
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)

สายทิพย์ เรื่องมา : การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์และลักษณะสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ (ISOLATION OF BIOPOLYMER-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE BIOPOLYMER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน 116 หน้า.

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไบโอพอลิเมอร์จากแหล่งอาหารหมักต่างๆ ในประเทศไทย ทั้งหมด 102 ตัวอย่าง คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์สูงสุด คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 จากเต้าหู้ยี้ ตลาดบางซื่อ กรุงเทพฯ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8% และเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าจากภาวะดังกล่าวสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้เท่ากับ 25.013 กรัมต่อลิตร นำไบโอพอลิเมอร์ที่ได้ทำบริสุทธิ์บางส่วน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์โดยใช้ Analytical TLC พบว่ามีส่วนประกอบเพียง 1 ส่วนที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.5 ซึ่งตรงกับกรดแอสกลูตามิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เป็นสารมาตรฐาน และเมื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย HPLC ก็พบว่ามีกลูตาเมตเพียงชนิดเดียว โครงสร้างไบโอพอลิเมอร์ที่ได้จาก FT-IR มีค่าลำดับส่วนในช่วง 1638.10-3435.67 ต่อเซนติเมตร ซึ่งเป็นค่าของ γ -PGA และเมื่อวิเคราะห์โดย SDS-PAGE ไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 209,000 ดาลตัน และมีสมบัติเป็นประจุลบ เมื่อจำแนกสายพันธุ์ BA 13-0-1 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าน่าจะเป็น *Bacillus amyloliquefaciens*

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา: ..จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต: ..สายทิพย์ ธีระ.....

สาขาวิชา: ..จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก: ..จิราภรณ์ ธนียวัน.....

ปีการศึกษา:2551.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม: ..สุเทพ.....

4872504723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: BIOPOLYMER/ *Bacillus amyloliquefaciens*/ PGA

SAITIP RUANGMA: ISOLATION OF BIOPOLYMER-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE BIOPOLYMER. THESIS PRINCIPLE ADVISOR: ASSOC.PROF. JIRAPORN THANİYAVARN, THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHEP THANİYAVARN, Ph. D. 116 p.

In an attempt to obtain biopolymer producing-bacteria, one hundred and two bacteria samples were isolated from various fermented foods in Thailand. Among these, a strain designated BA 13-0-1, isolated from fermented tofu at Bang-Sue, Bangkok province gave the highest biopolymer product. Suitable medium and conditions for bacterial growth at pH 7.5, 30°C with 200 rpm-shaking for 42 hours and adding monosodium glutamate at 10 hour of production time obtained polymer at 25.013 g/L. Characterization of biopolymer upon acid hydrolysis by TLC and HPLC indicated a homopolymer in nature consisted solely of glutamate. FT-IR chromatogram showed that characteristic band at $1638.10\text{-}3435.67\text{ cm}^{-1}$ for γ -PGA. SDS-PAGE revealed its respective high molecular weight biopolymer and net anionic charged. Taxonomic studies via its morphological, biochemical and 16S rDNA characteristics indicated strain BA 13-0-1 is closed related to *Bacillus amyloliquefaciens*.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department:..Microbiology.....Student's Signature: *Saitip Ruangma*.....

Field of Study: ..Industrial Microbiology.....Thesis Principle Advisor's Signature: *Jiraporn Thaniyavarn*

Academic Year: ..2008.....Co-advisor's Signature: *Suthep Thaniyavarn*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนความคิดเห็นต่างๆในการทำวิจัย รวมทั้งการ แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธาน กรรมการในการสอบ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และ อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนคำแนะนำและตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา รวมทั้งพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ที่มีส่วน ช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

และขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่น้องที่ให้การสนับสนุน ตลอดจนให้กำลังใจ แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2549

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 ไบโอฟอลิเมอร์ (Biopolymer).....	4
2.2 พอลิเอไมด์ (Polyamide).....	4
2.3 กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid หรือ PGA).....	7
2.4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิก.....	8
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิก.....	10
2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต γ -PGA.....	15
2.7 การทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์โครงสร้างของ PGA.....	23
2.8 การประยุกต์ใช้ PGA ในด้านต่างๆ.....	23
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	28
3.1 อุปกรณ์.....	28
3.2 เคมีภัณฑ์.....	30
3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอฟอลิเมอร์.....	32
3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอฟอลิเมอร์ในระดับขวดเย้า.....	32
3.5 การศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร..	33
3.6 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอฟอลิเมอร์.....	34
3.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตไบโอฟอลิเมอร์.....	35

บทที่	หน้า
3.8 การผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	37
3.9 การทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์.....	37
3.10 การวิเคราะห์ส่วนประกอบในไบโอพอลิเมอร์.....	38
3.11 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซโตเดียมโตเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	39
3.12 การวิเคราะห์โครงสร้างของไบโอพอลิเมอร์โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer.....	40
3.13 การวิเคราะห์ชนิดประจุของไบโอพอลิเมอร์.....	40
3.14 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ทางอนุกรมวิธาน.....	40
4. ผลการทดลอง.....	45
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	45
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับขวดเขย่า.....	46
4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์สูงสุดในระดับขวดเขย่า.....	48
4.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร..	49
4.5 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	52
4.6 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	60
4.7 การผลิต การสกัดและการทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์.....	68
4.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบในไบโอพอลิเมอร์.....	70
4.9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซโตเดียมโตเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	73
4.10 การวิเคราะห์โครงสร้างไบโอพอลิเมอร์โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer.....	75
4.11 การวิเคราะห์ชนิดประจุของไบโอพอลิเมอร์.....	77
4.12 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ทางอนุกรมวิธาน.....	78
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	86
รายการอ้างอิง.....	93

	หน้า
ภาคผนวก.....	103
ภาคผนวก ก.....	104
ภาคผนวก ข.....	106
ภาคผนวก ค.....	113
ภาคผนวก ง.....	115
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	116



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PGA.....	14
2.2 แบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ทั้งชนิดที่ต้องการและไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิต.....	16
2.3 ส่วนประกอบในอาหารสูตร E สำหรับการผลิต γ -PGA โดย <i>B. licheniformis</i> ATCC 9945A.....	17
2.4 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารและภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก.....	21
3.5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาถูกโซพอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	43
4.6 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก ถั่วหมักจากแหล่งต่างๆ.....	45
4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไบโอพอลิเมอร์ที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 28 สายพันธุ์สามารถผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกำหนดสูตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	46
4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไบโอพอลิเมอร์ที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่สามารถผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกำหนดสูตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	49
4.9 ค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	50
4.10 ผลการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	52
4.11 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	54
4.12 ผลการแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	56
4.13 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	57
4.14 ผลการแปรผันความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	59
4.15 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	60
4.16 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	61
4.17 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	62

ตารางที่	หน้า
4.18 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	65
4.19 ผลการศึกษาช่วงเวลาในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	67
4.20 ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนทั้งก่อนและหลังการทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์.....	69
4.21 ผลการศึกษาเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา.....	80
4.22 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1.....	81
4.23 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 (ต่อ).....	82
4.24 ผลการทดสอบการทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1.....	83
4.25 ผลการพิสูจน์ลักษณะบางประการของ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> และแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1.....	84
4.26 สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1.....	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดพอลิอะมิโนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ -PGA) เอฟซิลอนพอลิไลซีน (ϵ -lysine) และไซยาโนไฟซิน (cyanophycin).....	5
2.2 สูตรโครงสร้างของกรดแกมมาพอลิกลูตามิก.....	7
2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต γ -PGA ของ <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus subtilis</i> และ <i>Bacillus licheniformis</i>	9
2.4 แบบจำลองของการสังเคราะห์ PGA โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีกลูตาเมตและ ATP เป็นสารตั้งต้น.....	10
2.5 แบบจำลองขั้นตอนการสังเคราะห์ γ -PGA.....	11
2.6 วิธีการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกใน <i>Bacillus subtilis</i> IFO3335.....	13
2.7 สมการแสดงการเปลี่ยนจากกรดแอลกลูตามิกเป็นกรดดีกลูตามิก.....	14
4.8 เปรียบเทียบลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ.....	48
4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ BA 13-0-1 และการผลิตไบโอพอลิเมอร์.....	51
4.10 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักรวมของไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งจากการแปรผันแหล่งคาร์บอน.....	53
4.11 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักรวมของไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งจากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน..	55
4.12 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักรวมของไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งจากการแปรผันแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.13 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักรวมของไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งจากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	58
4.14 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักรวมของไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งจากการแปรผันความเข้มข้นของโมโนไซเตียมกลูตาเมต.....	59
4.15 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักรวมของไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งจากการแปรผันค่าความเป็นกรดเบส.....	61

รูปที่	หน้า
4.16 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันอุณหภูมิ.....	62
4.17 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น.....	64
4.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และการผลิตไบโอพอลิเมอร์หลังการศึกษาภาวะที่เหมาะสม.....	66
4.19 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันช่วงเวลาในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต.....	68
4.20 ไบโอพอลิเมอร์ในรูปผงแห้ง ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์ BA 13-0-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตร.....	69
4.21 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย Analytical Thin Layer Chromatography.....	70
4.22 โคโรมาโทแกรมของ HPLC จากไบโอพอลิเมอร์บริสุทธิ์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก.....	71
4.23 โคโรมาโทแกรมของ HPLC จากกรดแอลกลูตามิก (γ) และโมโนโซเดียมกลูตาเมต (ซ) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน.....	72
4.24 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์ โดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	74
4.25 โคโรมาโทแกรมของ FT-IR ของไบโอพอลิเมอร์.....	75
4.26 โคโรมาโทแกรมของ FT-IR ของพอลิกรดแกมมากลูตามิกซัลโฟเนต (γ-PGA-sulfonate).....	76
4.27 โคโรมาโทแกรมของ FT-IR ของพอลิกรดแกมมากลูตามิกบริสุทธิ์ที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp.	76
4.28 ตะกอนที่เกิดขึ้นจากสารละลายเซติลไพรีดีเนียมคลอไรด์ (CPC) และไบโอพอลิเมอร์.....	77
4.29 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 บนอาหารแข็ง LB.....	78

รูปที่	หน้า
4.30 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	79
4.31 ลักษณะสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	79
4.32 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 บน PDA.....	84



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) หมายถึง พอลิเมอร์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเชื่อมต่อกันของหน่วยย่อย เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิก ซ้ำๆ โดยสามารถจำแนกไบโอพอลิเมอร์ได้เป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ กลุ่มกรดนิวคลีอิก เช่น ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ กลุ่มพอลิเอไมด์ เช่น โปรตีน และกรดพอลิกลูตามิก กลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เซลลูโลส แป้ง แขนแทน กลุ่มพอลิเอสเทอร์ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต กลุ่มพอลิไอโซพรีนอยด์ เช่น ยางจากพืช และกลุ่มพอลิฟีนอล เช่น ลิกนิน กรดฮิวมิก (Ralph และคณะ, 2006) ไบโอพอลิเมอร์หลายชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียและรา เช่น ไบโอพอลิเมอร์ ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ทั้งในแบคทีเรียและรา โดยในแบคทีเรีย ได้แก่ แขนแทนจาก *Xanthomonas campestris* เดกซ์แทรนจาก *Leuconostoc mesenteroides* แอลจีเนตจาก *Pseudomonas aeruginosa* เคอร์ดีแลนจาก *Alcaligenes faecalis* เจลแลนจาก *Pseudomonas elodea* นอกจากนี้ *Bacillus* sp. CP912 ยังมีรายงานว่าสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงด้วย (Jennifer และ Quarmby, 1999) ในรา ได้แก่ พัลลูแลนจาก *Aureobasidium pullulans* สเคลอโรกูแคนจาก *Sclerotium glutanicum* (Grazer และ Nikaido, 1994) นอกจากพอลิแซ็กคาไรด์ยังมีไบโอพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ เช่น พอลิเมอร์ชนิดบีตาไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (beta-hydroxyalkanoates) ที่สามารถผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* (Findlay และ White, 1983) และ *Bacillus licheniformis* ก็สามารถผลิตสารตกตะกอนชีวภาพ (bioflocculation) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สำคัญที่แบคทีเรียสร้างขึ้นระหว่างการเจริญ เพื่อการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย (Shih และคณะ, 2001) ในปัจจุบันพบว่ามีการนำไบโอพอลิเมอร์ไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างแพร่หลายเนื่องจากสมบัติที่ย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพและไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

กรดพอลิอะมิโน คือ ไบโอพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่กล่าวได้ว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีน โดยโปรตีนสังเคราะห์จากข้อมูลบนดีเอ็นเอ โดยนำกรดอะมิโนมาเรียงต่อกันด้วยลำดับที่จำเพาะเจาะจง กรดอะมิโนเหล่านี้จะเชื่อมต่อดัวยพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน ทำให้เกิดเป็นโปรตีน (รวมถึง เอนไซม์ สารพิษ ฮอริโมน) อย่างไรก็ตามยังมีกรดอะมิโนสายยาวจำนวนหนึ่งที่สังเคราะห์จากวิธีที่ต่างออกไปจากที่กล่าวมาในจุลินทรีย์บางชนิด คือกรดพอลิอะมิโนซึ่งพบว่ากรดพอลิอะมิโนไม่ใช่โปรตีนและมีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่จำเพาะซึ่งกระบวนการสังเคราะห์เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์นำกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวมาเรียงต่อกัน

จนเป็นสายยาว ตัวอย่างเช่น กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ -poly-glutamic acid) หรือ PGA ที่สามารถพบได้ในเมือกของอาหารท้องถิ่นของชาวญี่ปุ่น "นัตโตะ (natto)" ซึ่งเกิดจากการหมักถั่วเหลืองโดย *Bacillus* sp. (Kunioka และ Furusawa, 1997; Fuji, 1963) โดยโครงสร้างจุลภาคของ PGA จะต่างจากโปรตีน ในปี 1997 ได้มีการพบกรดพอลิอะมิโนชนิดพอลิแอลโลซีน (L-polylysine) หรือ PL จากแอคติโนมัยซีต *Streptomyces albul* ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่น โครงสร้างจุลภาคของ PL คือกรดอะมิโนไลซีนต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่แอลฟาคาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน (Kunioka และ Furusawa, 1997)

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก คือสายยาวของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันที่ต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ (homo-polyamide) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยสารประกอบชนิดนี้เป็นประจุลบ ซึ่งเกิดจากหน่วยของกรดอะมิโนชนิดดีกลูตามิกและ/หรือแอลกลูตามิก เชื่อมต่อกันระหว่างหมู่แอลฟาอะมิโนและแกมมาคาร์บอกซิลด้วยพันธะเอไมด์ ซึ่งพบครั้งแรกว่าเป็นองค์ประกอบของแคปซูลใน *Bacillus anthracis* (Shih และ Van, 2001) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ Inatsu และคณะ (2002) ยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ได้จากอาหารประเภทถั่วหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูง Birrer และคณะ (1994) พบว่าแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมักก็สามารถผลิต PGA ได้นอกจากนี้ ยังสามารถคัดแยกได้จากดินอีกด้วย (Xu และคณะ, 2005)

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก เป็นผลิตภัณฑ์ที่แบคทีเรียหลั่งออกมาออกเซลล์ ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ ละลายน้ำได้ และไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ PGA เป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000-1,000,000 ดาลตัน (Birrer และคณะ, 1994) เนื่องจากสมบัติของ PGA ที่สามารถละลายน้ำได้ ย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ สามารถรับประทานได้ และไม่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการนำเอา PGA และอนุพันธ์ของ PGA มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา และกระบวนการบำบัดน้ำเสีย โดยนำมาประยุกต์ใช้เป็น สารเพิ่มความข้น (thickener) สารดูดความชื้น (humectants) ตัวนำพา (drug carrier) สารควบคุมการปลดปล่อยฤทธิ์ยา (sustained release materials) สารดูดซับน้ำ (highly water absorbable) และ เส้นใยย่อยสลายโดยธรรมชาติ (biodegradable fibers) (Shih และ Van, 2001)

จากงานวิจัยต่างๆพบว่า *Bacillus* sp. ในหลายๆสายพันธุ์ สามารถผลิต PGA ซึ่งเป็นสารที่มีความหนืดออกมาออกเซลล์ ในปริมาณที่ต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสารอาหารและภาวะในการเลี้ยงเชื้อและการผลิต โดยพบว่าสารอาหารที่แบคทีเรียต้องการในการผลิต PGA จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ (Thorne และคณะ, 1953) ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิเพปไทด์ รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบของอาหารและภาวะที่

เหมาะสมต่อการผลิต ลักษณะสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ เพื่อนำไปพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต รวมทั้งศึกษาลักษณะสมบัติและวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์
2. ศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร
3. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์
4. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์
5. การผลิต สกัดแยก และทำให้บริสุทธิ์
6. การศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้
7. จำแนกสกุลของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์และทราบองค์ประกอบของอาหารรวมทั้งภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ และทราบลักษณะสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลเพื่อใช้พัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

ไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymer)

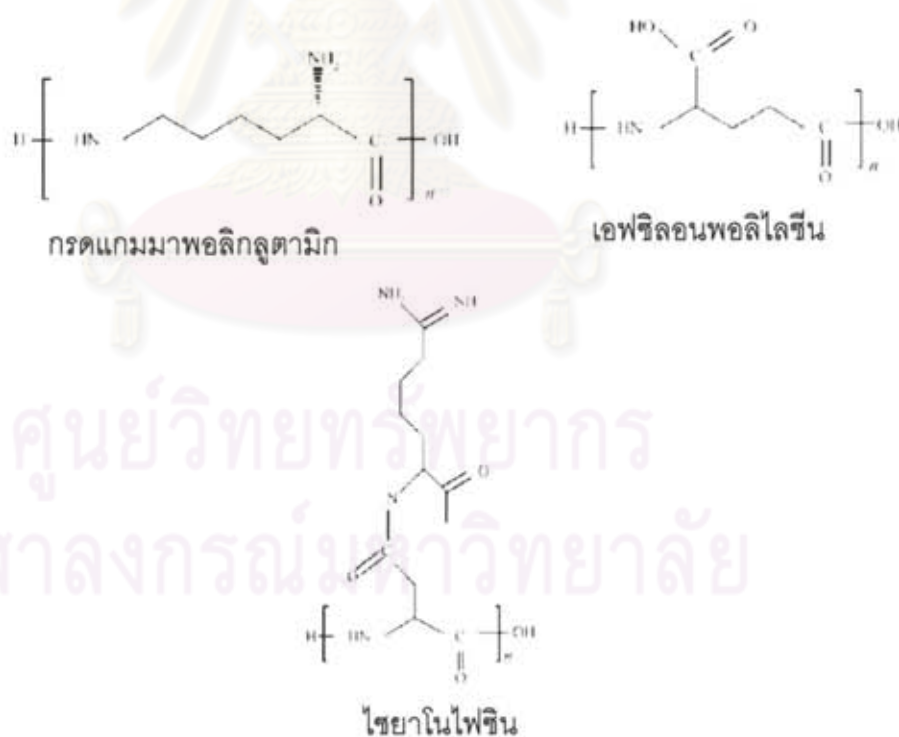
ไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) หมายถึง พอลิเมอร์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเชื่อมต่อกันของหน่วยย่อย เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิก ซ้ำๆ กัน โดยสามารถจำแนกไบโอพอลิเมอร์ได้เป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ กลุ่มกรดนิวคลีอิก เช่น ดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ กลุ่มพอลิเอไมด์ เช่น โปรตีน และ กรดพอลิกลูตามิก กลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เซลลูโลส แป้ง แขนแทน กลุ่มพอลิเอสเทอร์ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต กลุ่มพอลิไอโซพรีนอยด์ เช่น ยางจากพืช และ กลุ่มพอลิฟีนอล เช่น ลิกนิน กรดฮิวมิก (Ralph และคณะ, 2006) ไบโอพอลิเมอร์หลายชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียและรา เช่น ไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ทั้งในแบคทีเรียและรา โดยในแบคทีเรีย ได้แก่ แขนแทนจาก *Xanthomonas campestris* เดกซ์แทรนจาก *Leuconostoc mesenteroides* แอลจีเนตจาก *Pseudomonas aeruginosa* เคอร์ดีแลนจาก *Alcaligenes faecalis* เจลแลนจาก *Pseudomonas elodea* นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *Bacillus* sp. CP912 สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงด้วย (Jennifer และ Quarmby, 1999) ในรา ได้แก่ พัลลูแลนจาก *Aureobasidium pullulans* สเคลอโรกลูแคนจาก *Sclerotium glutanicum* (Grazer และ Nikaido, 1994) นอกจากพอลิแซ็กคาไรด์ยังมีไบโอพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ เช่น พอลิเมอร์ชนิดบีตาไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (beta-hydroxyalkanoates) ที่สามารถผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* (Findlay และ White, 1983) และ *Bacillus licheniformis* ก็สามารถผลิตสารตกตะกอนชีวภาพ (bioflocculation) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สำคัญที่แบคทีเรียสร้างขึ้นระหว่างการเจริญ เพื่อการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย (Shih และคณะ, 2001) ในปัจจุบันพบว่ามีกานำไบโอพอลิเมอร์ไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลายเนื่องจากสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพและไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

พอลิเอไมด์ (Polyamide)

พอลิเอไมด์ หมายถึง กลุ่มของสารประกอบพอลิเมอร์ซึ่งเชื่อมต่อกันโดยพันธะเอไมด์ พอลิเอไมด์ประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มกรดพอลิอะมิโนซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียว และกลุ่มโปรตีนซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างระหว่างกรดพอลิอะมิโนและ

โปรตีนในด้านอื่นๆ ได้แก่ 1) โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่หลากหลายในขณะที่กรดพอลิอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น 2) โปรตีนสังเคราะห์โดยตรงจากดีเอ็นเอ โดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน คือ สังเคราะห์โดยการถอดรหัสและแปลรหัสพันธุกรรม แต่กรดพอลิอะมิโนเกิดจากการสังเคราะห์โดยการกระตุ้นของกลุ่มเอนไซม์ นำกรดอะมิโนมาเรียงต่อกัน จึงทำให้สารยับยั้งกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม เช่น คลอแรมฟินิโคลไม่ส่งผลยับยั้งต่อการสังเคราะห์กรดพอลิอะมิโน 3) มวลโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีค่าคงที่หรือกล่าวอีกแง่คือ เราสามารถกำหนดความยาวของสายโปรตีนได้ ในขณะที่มวลโมเลกุลของกรดพอลิอะมิโนมีขนาดที่แตกต่างกัน ไม่สามารถกำหนดขนาดได้ 4) พันธะเอไมด์ในโปรตีนเกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างหมู่แอลฟาอะมิโนและหมู่แกมมาคาร์บอกซิล เกิดเป็นพันธะแอลฟาเอไมด์ แต่พันธะเอไมด์ในกรดพอลิอะมิโนเกิดจากการเชื่อมต่อดังตำแหน่งอื่นๆของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล เช่น หมู่บีตา (β) และแกมมา (γ) คาร์บอกซิลและหมู่เอพิซิลอน (ϵ) อะมิโน (Shi และคณะ, 2007)

กรดพอลิอะมิโนที่พบในธรรมชาติมี 3 ชนิด ได้แก่ กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ -PGA) เอพิซิลอนพอลิไลซีน (ϵ -lysine) และไซยาโนไฟซิน (cyanophycin) โดยโครงสร้างของกรดพอลิอะมิโนทั้ง 3 ชนิดแสดงดังในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดพอลิอะมิโนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ -PGA) เอพิซิลอนพอลิไลซีน (ϵ -lysine) และไซยาโนไฟซิน (cyanophycin) (ดัดแปลงจาก Shi และคณะ, 2007)

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ -PGA) เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างกรดกลูตามิกชนิดดีและแอลโดยพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่แอลฟาอะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล (Chibnall และคณะ, 1958) เอฟซิลอนพอลิไลซีน (ϵ -lysine) เกิดจากหน่วยย่อยของไลซีนเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่แอลฟาคาร์บอกซิลและหมู่เอฟซิลอนอะมิโนของไลซีน (Shima และ Sakai, 1981) ส่วนกรดพอลิอะมิโนชนิดไซยาโนไฟซินมีความแตกต่างจากกรดพอลิอะมิโนทั้งสองชนิดที่ได้กล่าวมาในข้างต้น เนื่องจากไซยาโนไฟซินเกิดจากหมู่แอลฟาแอสพาร์ติกและอาร์จินีนเชื่อมต่อกับหมู่บีตาคาร์บอกซิล (Simon และ Weathers, 1976)

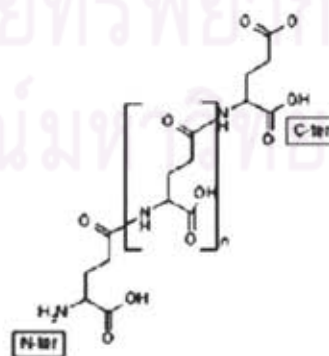
เอฟซิลอนไลพอลิซีน (ϵ -lysine) เป็นกรดไฮโมพอลิอะมิโนที่มีพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่แอลฟาคาร์บอกซิลและหมู่เอฟซิลอนอะมิโนของไลซีนดังแสดงในรูปที่ 2.1 พบเป็นครั้งแรกโดย Shima และ Sakia (1977) ซึ่งเป็นสารประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces albulus* 346 และจากการพิสูจน์โครงสร้างก็พบว่าสารดังกล่าวประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรดอะมิโนแอลไลซีนเพียงชนิดเดียว โดยมีความยาวของเอฟซิลอนพอลิไลซีนที่ผลิตขึ้นจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวประมาณ 25 หน่วยย่อยของแอลไลซีน (Shima และ Sakai, 1977; Shima และ Sakai, 1981) ซึ่งเอฟซิลอนพอลิไลซีนที่ผลิตจากเชื้อต่างสายพันธุ์ก็จะมี ความยาวของสายพอลิเมอร์ต่างกันไป (Nishikawa และ Ogawa, 2002; Saimura และคณะ, 2002) ได้มีการนำเอฟซิลอนพอลิไลซีนไปใช้เพื่อเป็นยาปฏิชีวนะ เนื่องจากเอฟซิลอนพอลิไลซีนมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายกลุ่ม เช่น รา ได้แก่ *Aspergillus niger* IFO4416 *Trichophyton mentagrophytes* IFO7522 ยีสต์ ได้แก่ *Candida acutus* IFO1912 *Phaffia rhodozyma* IFO10129 *Pichia anomala* IFO0146 *Pichia membranaefaciens* IFO0577 *Rhodotorula lactase* IFO1423 *Sporobolomyces roseus* IFO1037 *Sacchromyces cerevisiae* *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 11301 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Geobacillus stearothermophilus* IFO12550 *Bacillus coagulans* IFO12583 *Bacillus subtilis* IAM1069 เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Raoultella planticola* IFO3317 *Campylobacter jejuni* *Escherichia coli* IFO13500 เป็นต้น ทั้งยังมีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารถนอมอาหารซึ่งสามารถใช้ในปริมาณน้อยและไม่ทำให้รสชาติอาหารเสียไปด้วย นอกจากนี้ยังมีการนำเอฟซิลอนพอลิไลซีนไปสังเคราะห์ไฮโดรเจลโดยเชื่อมเอฟซิลอนพอลิไลซีนกับพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรและการแพทย์อีกด้วย (Shi และคณะ, 2007)

ไซยาโนไฟซิน หรือ ไซยาโนไฟซินแกรนูลพอลิเพปไทด์ (CGP) ถูกค้นพบเมื่อ 100 กว่าปีมาแล้ว จากโครงสร้างของไซยาโนไฟซินดังแสดงในรูปที่ 2.1 สายของกรดพอลิอะมิโนดังกล่าวประกอบด้วยอาร์จินีนและกรดแอสพาร์ติกในปริมาณที่เท่ากันจัดเรียงเป็นสายหลักของแอสพาร์เทต ในขณะที่มีอาร์จินีนเกาะที่หมู่บีตาคาร์บอกซิลบนทุกตำแหน่งของกรดแอสพาร์ติก ขนาด

โมเลกุลของพอลิเมอร์ชนิดนี้มีความหลากหลายตั้งแต่ 25,000 ถึง 100,000 ดาลตัน โดยความแตกต่างระหว่าง γ -PGA และเอพซิลอนพอลิไลซีน กับ ไชยานิโไฟซิน คือ ไชยานิโไฟซินเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากไชยานิแบคทีเรียแล้วเก็บไว้ในเซลล์ ในขณะที่ γ -PGA และเอพซิลอนพอลิไลซีนเป็นพอลิเมอร์ที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ (Simon, 1987) เนื่องจากสมบัติของไชยานิโไฟซินคือ ละลายน้ำได้ดี มีความหนืดสูง และย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ จึงมีการนำไชยานิโไฟซินไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ คล้ายกับการประยุกต์ใช้ γ -PGA เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรมเกษตร เป็นต้น (Schwamborn, 1998)

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (Poly - γ - glutamic acid หรือ PGA)

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก คือ สายยาวของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันที่ต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ (homo-polyamide) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยไบโอพอลิเมอร์ชนิดนี้มีสมบัติเป็นประจุลบซึ่งเกิดจากหน่วยของกรดอะมิโนชนิดดีกลูตามิกและ/หรือแอลกลูตามิก เชื่อมต่อกันระหว่างหมู่แอลฟาอะมิโนและแกมมาคาร์บอกซิล ด้วยพันธะเอไมด์ (รูปที่ 2.2) เนื่องจากสมบัติทางเคมีของ PGA ที่แตกต่างจากโปรตีน คือ โปรตีนจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟาอะมิโนในขณะที่ PGA เป็นพันธะแกมมาอะมิโน จึงทำให้ PGA ทนต่อเอนไซม์โปรตีเอสซึ่งจะย่อยพันธะแอลฟาอะมิโน นอกจากนี้ในการตรวจผลบนอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (SDS-PAGE) ก็ต่างจากโปรตีนเนื่องจากการตรวจผล PGA ใช้เมธิลีนบลูในขณะที่โปรตีนใช้คумаซีบลู (Candela และ Fouet, 2005) มีการค้นพบกรดแกมมาพอลิกลูตามิกเป็นครั้งแรกว่าเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่แคปซูลของ *B. anthracis* โดยจะปล่อยออกมาระหว่างการฆ่าเชื้อ หรือเซลล์แตกเมื่อแก่และหมดอายุ (Shih และ Van, 2001)



กรดแกมมาพอลิกลูตามิก

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกรดแกมมาพอลิกลูตามิก (ดัดแปลงจาก Thomas และ Fouet, 2006)

กรดแกมมาพอลิกลูตามิกเป็นสารที่รู้จักดีเนื่องจากเป็นสารเหนียวหนืดที่มีอยู่ในนัตโตะ (natto) ซึ่งเป็นถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น โดยเป็นสารผลสมระหว่างกรดพอลิกลูตามิกและฟรักแทนที่สามารถผลิตโดย *Bacillus natto* Sawamura (Sawamura, 1913; Fuji, 1963) จากการศึกษาของ Bovarnick (1942) แสดงให้เห็นว่า ในการหมักโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus subtilis* จะสามารถปล่อยกรดแกมมาพอลิกลูตามิกออกมาได้อย่างอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ และนอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถสร้างกรดแกมมาพอลิกลูตามิกได้โดยการปล่อยออกมานอกเซลล์ (Cheng และคณะ, 1989; Goto และ Kunioka, 1992; Hara และคณะ, 1982a,b; Housewright, 1962; Kubota และคณะ, 1993a,b; Murao, 1969; Thorne และคณะ, 1954; Troy, 1973) นอกจากนี้ยังมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่สามารถผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกได้อีกด้วย ได้แก่ *Natronococcus occultus* (Niemetz และคณะ, 1997) และในกลุ่มนีมาโทด คือ ไฮดรา (Weber, 1990) พบว่าพอลิเมอร์ของ กรดกลูตามิกจับอยู่กับกรดฟอสฟอริก (McGuire และ Coward, 1984) และในโครงสร้างของโปรตีนชนิดทูบูลิน (Edde และคณะ, 1990)

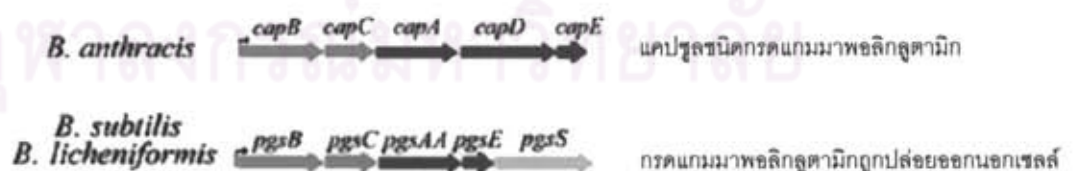
กรดแกมมาพอลิกลูตามิก เป็นผลิตภัณฑ์ที่แบคทีเรียหลั่งออกมานอกเซลล์ ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ ละลายน้ำได้ และไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ กรดแกมมาพอลิกลูตามิกเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000-1,000,000 ดาลตัน (Birrer และคณะ, 1994) เนื่องจากสมบัติของกรดแกมมาพอลิกลูตามิกที่สามารถละลายน้ำได้ ย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ สามารถรับประทานได้ และไม่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการนำเอา แกมมาพอลิกลูตามิกและอนุพันธ์ของกรดแกมมาพอลิกลูตามิกมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา และกระบวนการบำบัดน้ำเสีย โดยนำมาประยุกต์ใช้เป็น สารเพิ่มความข้น (thickener) สารดูดความชื้น (humectants) ตัวนำพายา (drug carrier) สารควบคุมการปลดปล่อยฤทธิ์ยา (sustained release materials) สารดูดซับน้ำ (highly water absorbable) เส้นใยย่อยสลายโดยธรรมชาติ (biodegradable fibers) และตัวดูดซับโลหะหนัก (heavy metal absorber) (Shih และ Van, 2001)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิก

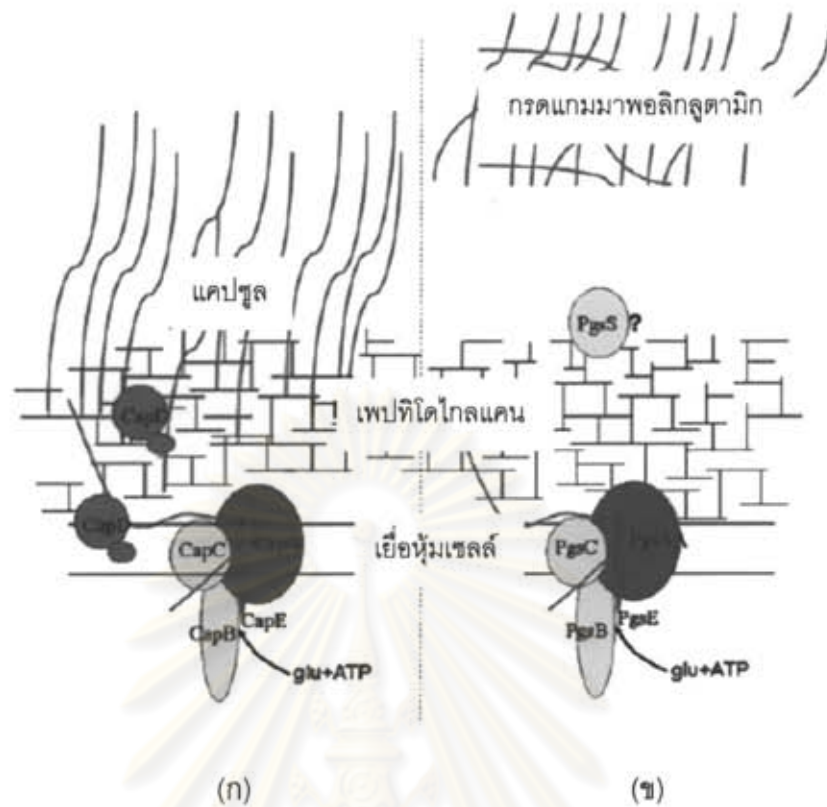
กรดแกมมาพอลิกลูตามิกเป็นสารที่มีโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างจากโปรตีนถึงแม้ว่าจะเกิดจากการต่อกันของกลูตาเมตด้วยพันธะแกมมาเอไมด์เหมือนกับโปรตีน และนอกจากนี้กระบวนการสังเคราะห์ก็ไม่ขึ้นกับไรโบโซมอีกด้วย จากการศึกษาของ Vietri และคณะ (1995) พบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PGA ใน *B. anthracis* เป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ซึ่งอยู่บน

พลาสมิด ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาด้วยรายงานของ Green และคณะ (1985) และ Uchida และคณะ (1985) ซึ่งพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PGA ใน *B. anthracis* อยู่บนพลาสมิด pXO2 อีกด้วย แต่ในรายงานของ Onodera และคณะ (1994) กลับพบว่าใน *B. subtilis* TAM-4 ไม่มีพลาสมิดและยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้จะอยู่บนจีโนมิตีเอ็นเอ ซึ่งคล้ายกับการรายงานของ Nagai และคณะ (1997) ซึ่งกล่าวว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต γ -PGA ไม่ได้อยู่บนพลาสมิด แต่จะอยู่บนจีโนมิตีเอ็นเอของ *B. subtilis* (natto) ซึ่งต่างจากรายงานของ Hara และ Ueda (1982) และ Hara และคณะ (1982a,b) ซึ่งพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกใน *B. subtilis* (natto) นอกจากจะอยู่บน พลาสมิดแล้วยังปรากฏบนจีโนมิตีเอ็นเออีกด้วย

จากรายงานของ Ashiuchi และคณะ (1998) ในการศึกษาเกี่ยวกับควบคุมการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกโดยการโคลนจีโนมิตีเอ็นเอ ของ *B. subtilis* IFO 3336 ใส่ใน *Escherichia coli* พบว่ามี 3 ยีนที่ควบคุมระบบการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ -Poly-glutamate synthetic system หรือ PGS system) ได้แก่ *pgsB*, *pgsC* และ *pgsA* ซึ่งยีน *pgsBCA* มีความเหมือนกับยีน *capB capC capA* และ *capE* ของ *B. anthracis* ซึ่งมีรหัสของกรดอะมิโนทั้งหมด 47 หน่วยที่จำเป็นสำหรับการผลิต PGA (Candela และคณะ, 2005) (รูปที่ 2.3) ซึ่งยีน *pgsBCA* ใน *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ส่งผลให้ PGA ที่สร้างขึ้นปล่อยออกมาออกเซลล์ ในขณะที่ยีน *capBCA* ใน *B. anthracis* เป็นยีนที่ควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความสำคัญในการสร้างแคปซูลที่ประกอบด้วยกรดแกมมาพอลิกลูตามิกชนิดแอล (Makino และคณะ, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Urushibata และคณะ, 2002; Candela และคณะ, 2005) นอกจากนี้ในการผลิต γ -PGA ยังต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของยีนกลูตาเมตราซีเมสซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์กลูตาเมตราซีเมสซึ่งใช้ในกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างของกรดแกมมาพอลิกลูตามิกอีกด้วย (Leonard และคณะ, 1958)



รูปที่ 2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต γ -PGA ของ *Bacillus anthracis* *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* (ดัดแปลงจาก Thomas และ Fouet, 2006)



รูปที่ 2.4 แบบจำลองของการสังเคราะห์ PGA โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีกลูตามิตและ ATP เป็นสารตั้งต้น (ดัดแปลงจาก Thomas และ Fouet, 2006)

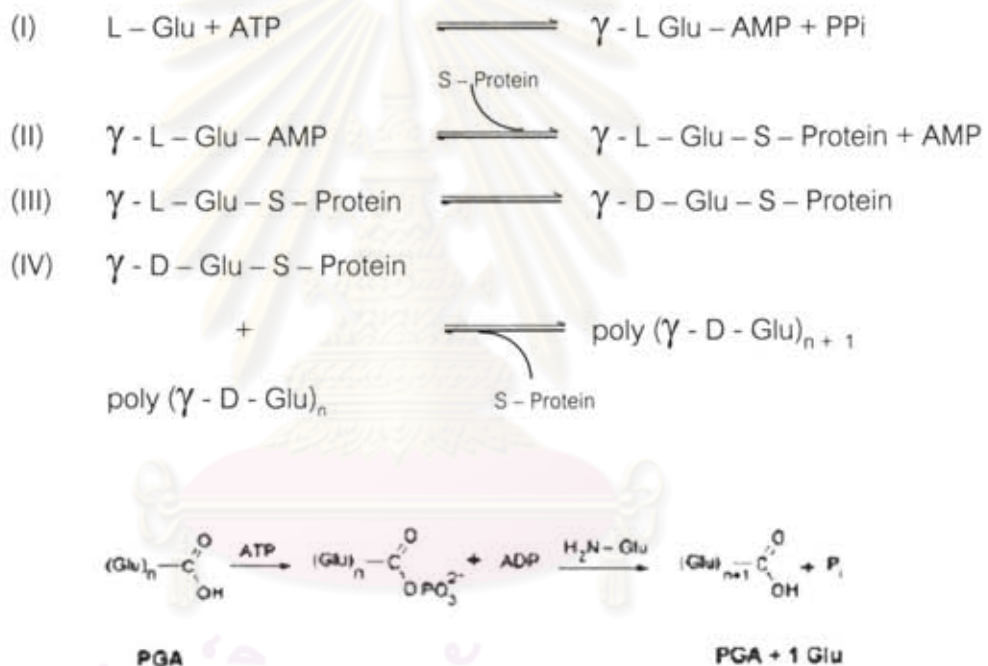
(ก) PGA ที่สร้างขึ้นเกาะกับเพปทิโดไกลแคนกลายเป็นแคปซูลโดยผ่าน CapD ซึ่งเกิดขึ้นในการสังเคราะห์ PGA ของ *B. anthracis* หรือ *S. epidermidis*

(ข) PGA ที่สร้างขึ้นและปล่อยออกนอกเซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นในการสังเคราะห์ PGA ของ *B. subtilis* และ *B. licheniformis*

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิก

จากการศึกษาของ Hara และคณะ (1986) พบว่ายีน *pUH1* และ *PLS11* ซึ่งอยู่บนพลาสมิดโดยจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ γ -glutamyltranspeptidase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งหมู่เอมิโนให้กับ α -Ketoglutaric acid ในกระบวนการสังเคราะห์ PGA ของ *Bacillus* sp. โดยยีนดังกล่าวของ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากถั่วเน่าพบว่ามีความคล้ายกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGA ที่พบใน *B. subtilis* (natto) ซึ่งเช่นเดียวกับ Kambourova และคณะ (2001) ที่ค้นพบว่าเอนไซม์ γ -glutamyltranspeptidase มีผลกระตุ้นต่อการผลิต PGA ของ *B. licheniformis* ซึ่งการผลิตจะถูกควบคุมด้วยกลูตามิตที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่กลับไม่พบเอนไซม์นี้ใน *B. subtilis* S317

โดยจากการศึกษาของ Troy (1973) ทำให้ทราบถึงกระบวนการต่อสายยาวของ PGA เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นกระบวนการเกี่ยวกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PGA คือ polyglutamyl synthetase complex ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. licheniformis* 9945A กระบวนการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการต่อสายยาวของพอลิเมอร์โดยอาศัยกรดแอลกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นในการผลิต γ -PGA ซึ่งกระบวนการทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ ATP และ Mg^{2+} (รูปที่ 2.5) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 โมเลกุล ATP จะกระตุ้นแอลกลูตามิต จากนั้น AMP จะเกาะกับกลูตามิตด้วยพันธะแกมมา ขั้นที่ 2 กลูตามิตที่ได้รับการกระตุ้นจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไทโอเอสเทอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างอย่างง่ายในการขนส่ง ขั้นที่ 3 กลูตามิตถูกส่งผ่านโดยโปรตีนที่เรียกว่า S-protein ขั้นที่ 4 กลูตามิตที่ถูกส่งเข้าไปโดย S-protein ก็จะเรียงสายต่อกันเป็น PGA



รูปที่ 2.5 แบบจำลองขั้นตอนการสังเคราะห์ γ -PGA (Troy, 1973; Ashiuchi และคณะ, 2001)

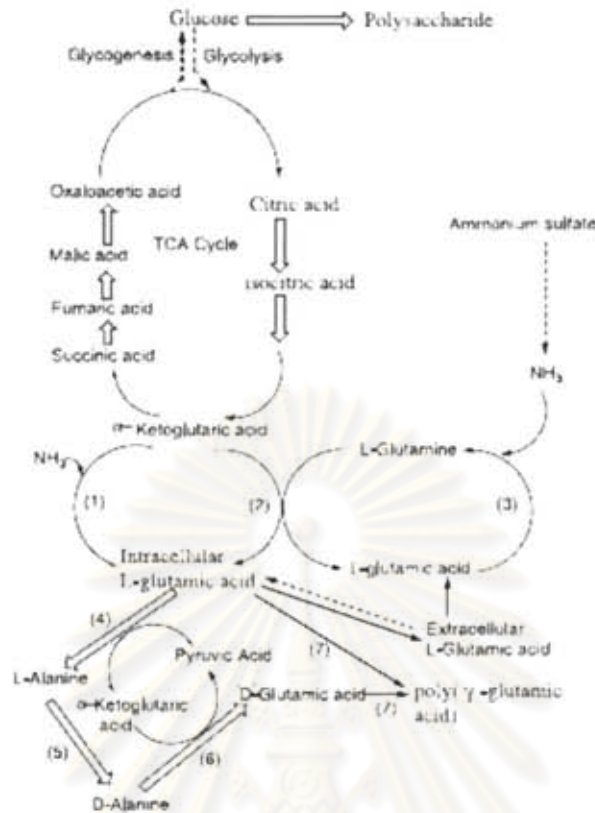
จากรายงานของ Leonard และคณะ (1985) ยังพบเอนไซม์ γ -PGA synthetase ที่มีความคล้ายคลึงกับ polyglutamyl synthetase complex คือจะใช้กรดแอลกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและต้องการ Mn^{2+} เป็น co-factor แต่ก็สามารถใช้ Mg^{2+} หรือสารประจวบอีกแทนได้ รวมทั้งยังต้องอาศัย CTP, GTP, UTP, ADP, CDP และ GDP เพื่อสร้าง ATP

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Kunioka และ Furusawa (1997) ยังได้อธิบายวิธีการผลิต γ -PGA จากกรดแอลกลูตามิก (หรือแอลกลูตามีน) ซึ่งมีกรดซิตริกและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารตั้งต้นใน *B. subtilis* IFO3335 ดังรูปที่ 2.6 สามารถอธิบายได้ว่าการผลิต γ -PGA เกิดขึ้น

จากกรดซิตริกและแอมโมเนียมซัลเฟต โดยกรดซิตริกจะเปลี่ยนเป็นไอโซของกรดซิตริกและ α -Ketoglutaric acid (2-oxoglutamic acid) ใน TCA Cycle โดยในการเปลี่ยน α -Ketoglutaric acid ไปเป็นกรดแอลกลูตามิก สามารถเกิดได้ 2 วิธีทางที่แตกต่างกัน ซึ่งในกรณีที่ไม่มีกลูตามีน กรดกลูตามิกจะถูกสังเคราะห์จาก α -Ketoglutaric acid และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเอนไซม์ กลูตามัต ดีไฮโดรจีเนส (GD) (Stadtman, 1966) แต่ถ้าในกรณีที่มีแอลกลูตามีน ก็จะใช้วิธีทางอื่น ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลูตามิก ซินเทเตส (GS) และกลูตามีน-2-ออกโซกลูตาเรต อะมิโนทรานสเฟอไรส (GOGAT) (Holzer, 1969) โดย GS จะช่วยในการเปลี่ยนกรดแอลกลูตามิกและแอมโมเนียมซัลเฟต ไปเป็นแอลกลูตามีนและกรดแอลกลูตามิกที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในรูป 2.6



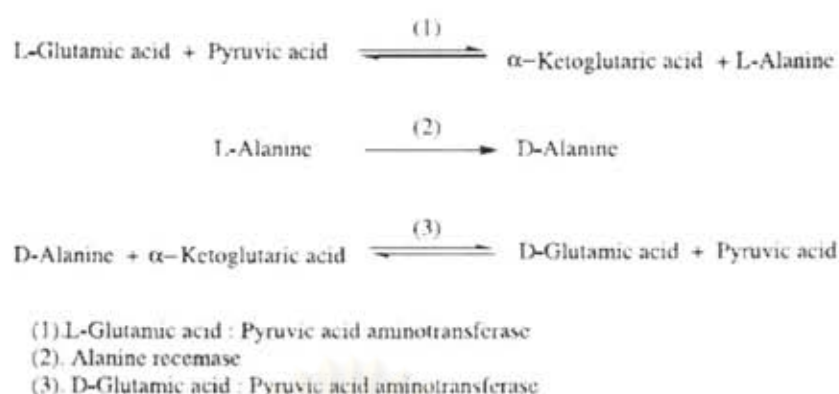
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- (1) Glutamate dehydrogenase (GDH)
- (2) Glutamate 2-oxoglutarate (α -ketoglutarate) aminotransferase (GOGAT)
- (3) Glutamine synthetase (GS)
- (4) L-Glutamic acid : Pyruvic acid aminotransferase
- (5) Alanine racemase
- (6) D-Glutamic acid L Pyruvic acid aminotransferase
- (7) PGA synthetase

รูปที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกใน *Bacillus subtilis* IFO 3335 (Shih และ Van, 2001)

Thorne และคณะ (1955) พบว่าในการผลิต γ -PGA ของ *B. licheniformis* จะต้องอาศัย 2 กระบวนการที่สำคัญได้แก่ transamidation และ transpeptidation ซึ่งจะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย alanine racemase และ D-L-glutamyl transaminase โดยจะเปลี่ยนกรดแอลกลูตามิกให้เป็นกรดดีกลูตามิก ซึ่งเป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของกรดกลูตามิกทางอ้อมดังสมการในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 สมการแสดงการเปลี่ยนจากกรดแอลกลูตามิกเป็นกรดดีกลูตามิก (Shih และ Van, 2001)

Ogawa และคณะ (1991) พบเอนไซม์ transglutaminase ที่แยกได้จาก *B. subtilis* NR-1 ซึ่งจากการรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ PGA พบว่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ก็จะมีเอนไซม์ที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จึงส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์ PGA เกิดในวิถีที่ต่างกันอีกด้วย

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PGA

เอนไซม์	กระบวนการ	แบคทีเรีย
Transglutaminase	การสร้างพอลิเมอร์ของ PGA	<i>B.subtilis</i> NR-1
Glutamyl transamidase	เปลี่ยนแอลกลูตามีนเป็นโครงสร้างอื่นของกรดกลูตามิกและกลูตามิลโดเพปไทด์ (transpeptidation)	<i>B. licheniformis</i> 9945A
Glutamyl transpeptidase	Transamidation และ transpeptiation	<i>B. licheniformis</i>
Alanine recemase	เปลี่ยนแอลอะลานีนเป็นดีอะลานีน	<i>B. anthracis</i>
Polyglutamyl synthetase complex	การยึดเกาะกันของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้กรดแอลกลูตามิกเป็นตัวกระตุ้น	<i>B. licheniformis</i>

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต γ -PGA

การศึกษาการผลิต γ -PGA ในช่วงแรก พบว่า PGA เป็นสารเมือกที่ถูกหลั่งออกมาออกเซลล์หรือเป็นส่วนประกอบของแคปซูลของ *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นสารจับโลหะหนักที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นแหล่งอาหารในระยะการเจริญคงที่ รวมทั้งใช้เพิ่มความสามารถของเซลล์ในการทนต่อภาวะรุนแรง เช่น ความเข้มข้นเกลือสูง (Thomas และ Fouet, 2006) แต่ต่อมาพบว่าการผลิต PGA สามารถควบคุมได้ แต่กลไกในการผลิตก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัดนัก จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจศึกษากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณ PGA สูงเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ โดยได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PGA ในปริมาณสูงจากแหล่งต่างๆ ทั้งที่แยกจากดิน (Kubota และคณะ, 1993a) อาหารหมักพื้นเมืองต่างๆ เช่น natto ของญี่ปุ่น (Tahara และคณะ, 1998) Kenima ถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองของประเทศเนปาล (Tamang และ Nikkuni, 1998) รวมทั้งถั่วเน่าของไทย (Sundhagul และคณะ, 1972) และแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสีย (Prasertsan และคณะ, 2000)

ซึ่งนอกจากสายพันธุ์แบคทีเรียแล้วยังมีปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PGA เพื่อให้ได้ปริมาณสูงและมีสมบัติตามวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกซึ่งได้แก่ สารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และการย่อยสลาย PGA

ความต้องการสารอาหาร

สารอาหารนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญประการแรกของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ ซึ่งจัดว่าเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์ PGA ให้ได้ตามที่ต้องการ สารอาหารหลัก ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และยังรวมถึงวิตามินหรือเกลือแร่ต่างๆ ที่จะเป็นตัวส่งเสริมให้การเจริญของแบคทีเรียเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังช่วยให้การผลิต PGA ได้ในปริมาณสูงตามที่ต้องการ จึงจำเป็นที่ต้องมีการคิดค้นปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เพื่อให้เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตและการผลิต PGA ให้ได้ปริมาณมาก

Bovarnick (1942) ได้ศึกษากระบวนการผลิต PGA เป็นคนแรก แต่ไม่ประสบความสำเร็จจนกระทั่งปี 1954 Thorne และคณะ ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PGA และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตให้ได้ปริมาณสูง โดยได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PGA เช่น เกลือ อนินทรีย์ กรดกลูตามิก กรดซิตริก กลีเซอรอล และรวมไปถึงปริมาณเชื้อที่ใช้ แต่สารอาหารที่นักวิจัยหลายคนให้ความสนใจคือ กรดแอลกลูตามิก ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญมากโดยจะเป็นสารตั้งต้นหลักของการผลิต PGA ใน TCA Cycle (Ko และ Gross, 1998) แต่ก็มีแบคทีเรียบาง

ชนิดที่การผลิต PGA ไม่ขึ้นอยู่กับกรดแอลกลูตามิก โดยเมื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรียตามความต้องการกรดกลูตามิก พบว่าสามารถจัดได้เป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ทั้งชนิดที่ต้องและไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิต

แบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ชนิดที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิก	แบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ชนิดที่ต้องการกรดแอลกลูตามิก
<i>B. subtilis</i> 5E (Murao, 1969)	<i>B. anthracis</i> (Thorne และคณะ, 1953)
<i>B. subtilis</i> TAM – 4 (Ito และคณะ, 1996)	<i>B. licheniformis</i> ATCC 9945A (Thorne และคณะ, 1954)
<i>B. licheniformis</i> A35 (Cheng และคณะ, 1989)	<i>B. subtilis</i> IFO 3335 (Goto และ Kunioka, 1992)
	<i>B. subtilis</i> F-2-01 (Kubuta และคณะ, 1993a, b)

แบคทีเรียที่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิต PGA

Thorne และคณะ (1954) ได้เพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ATCC 9945A ในอาหารสูตร C ที่มีสูตรอาหารประกอบด้วย กรดแอลกลูตามิก (20 กรัมต่อลิตร) กรดซิตริก (12 กรัมต่อลิตร) กลีเซอรอล (80 กรัมต่อลิตร) NH_4Cl (7.0 กรัมต่อลิตร) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 กรัมต่อลิตร) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.04 กรัมต่อลิตร) K_2HPO_4 (0.5 กรัมต่อลิตร) และน้ำประปา 1,000 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.4 พบว่าสามารถผลิต PGA ได้ 15 กรัมต่อลิตร และจากสูตรอาหารดังกล่าวมีกรดแอลกลูตามิกเป็นส่วนประกอบสำคัญเพราะถ้าไม่มีกรดแอลกลูตามิก เชื้อจะไม่สามารถผลิต PGA ได้ จากการศึกษาต่อมาโดย Leonard และคณะ (1958) พบว่าการใช้น้ำประปาลำหรับเตรียมอาหารสูตร C เป็นภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากในน้ำประปามีแร่ธาตุต่างๆ เช่น Mn^{2+} Ca^{2+} และ FeCl_3 ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ *B. licheniformis* ATCC 9945A โดยทำให้เซลล์มีความยาวมากขึ้น และทำให้การผลิต PGA เพิ่มขึ้นด้วย Leonard และคณะ (1958) จึงได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA โดย *B. licheniformis* คือ อาหารสูตร E (ตารางที่ 2.3) ที่มีความคล้ายกับ อาหารสูตร C แต่เปลี่ยนจากน้ำประปามาใช้น้ำกลั่นและมีการเพิ่ม Mn^{2+} และ Ca^{2+} ลงไป

นอกจากนี้การเติมแร่ธาตุต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้ส่งผลต่อปริมาณการผลิตแต่เพียงอย่างเดียว โดยจากการศึกษาของ Cromwick และ Gross (1995) พบว่าเมื่อเติม MgSO_4 ในอาหารสูตร E เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณ Mg^{2+} นอกจากปริมาณการผลิต PGA จะเพิ่มจาก 5 กรัม

ต่อลิตร เป็น 17 กรัมต่อลิตรแล้ว ยังส่งผลให้ปริมาณแอลกลูตามิกใน PGA เปลี่ยนแปลงอีกด้วย โดย Cromwick และ Gross (1995) ได้เพาะเลี้ยงแบบภาวะแบช ที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสแบบอัตโนมัติ และใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมี C^{13} เป็นตัวติดตาม และผลที่ได้คือ กรดซิตริกจะไม่มีผลต่อการสร้างพอลิเมอร์ของ γ -PGA ใน TCA cycle ส่วน Troy (1973) ใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่ากลูโคสจะถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตและการผลิต PGA ของ *B. licheniformis* ATCC 9945A ด้วย โดยการเลี้ยงในขวดชมพูแบบเขย่าทำให้ได้ปริมาณการผลิต PGA เท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Ko และ Gross (1998) ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นไปตามวิถีของ TCA cycle โดยสารมัธยันต์ที่สำคัญคือ แอลฟาคีโตกลูตาเรต (α -Ketoglutarate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นโดยตรงของการเปลี่ยนเป็นกลูตาเมต

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบในอาหารสูตร E สำหรับการผลิต γ -PGA โดย *B. licheniformis* ATCC 9945A (Leonard และคณะ, 1985)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
กรดแอลกลูตามิก	20.0
กรดซิตริก	12.0
กลีเซอรอล	80.0
NH_4Cl	7.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.04
K_2HPO_4	0.5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.15
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.000026-0.42
ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร	
ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.4	
ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	

ในการผลิต PGA ส่วนมากจะใช้สารอาหารที่สังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งส่งผลให้การผลิต PGA เพื่อใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมมีราคาแพง ดังนั้นจึงต้องหาแหล่งของสารอาหารที่ใช้ในการผลิตให้มีราคาถูกลง และจากการวิจัยของ Potter และคณะ (2001) ก็สอดคล้องกับวัตถุประสงค์

ข้างต้น และยังเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี โดยเขาได้ศึกษาการเปลี่ยนแอมโมเนียที่มีอยู่ในปุ๋ยคอกให้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้าง PGA โดยใช้ *B. licheniformis* ATCC9945A และ *B. subtilis* 1551 การทดลองดังกล่าวเป็นการลดแอมโมเนียอิสระแทนที่จะปล่อยออกสู่บรรยากาศ นอกจากนี้ PGA ที่ผลิตขึ้นยังส่งผลดีต่อพืช คือ PGA จะช่วยจับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ทำให้พืชดูดแร่ธาตุดังกล่าวได้ดียิ่งขึ้น จึงเป็นการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในปุ๋ยคอกเหลวให้เปลี่ยนเป็น PGA โดยพบว่าสามารถผลิตได้ในปริมาณ 0.85 และ 0.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในการผลิต PGA ให้ได้ปริมาณสูงขึ้น จะใช้ปุ๋ยคอกเหลวผสมกับอาหารสูตร E ที่มี โซเดียมกลูตาเมต กลูโคส และ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และได้มีการศึกษาถึงอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ ปุ๋ยคอกเหลว 54 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อน้ำประปา 33 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ อาหารสูตร E 13 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยมีปริมาณ PGA 4.8 กรัมต่อลิตร จากการศึกษานี้ก็ยังสามารถใช้ความรู้ที่ได้ไปคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ในการหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อประยุกต์ใช้กับการเกษตรได้จริง ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของปุ๋ยคอกเหลวสูง รวมทั้งการเจริญและผลิต PGA ได้ที่อุณหภูมิต่ำ แต่ทั้งนี้ก็ต้องปรับให้สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และมีราคาถูก

นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆเกี่ยวกับอาหารที่ใช้ในการผลิต PGA เช่น จากการคัดแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นเมืองของญี่ปุ่น (natto) และจัดจำแนกว่าเป็นสายพันธุ์ *B. subtilis* IFO 3335 (IFO Institute of Fermentation Osaka, Japan) ที่สามารถผลิต γ -PGA ได้มากถึง 9.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กรดซิตริก เป็นแหล่งคาร์บอน กรดแอลกลูตามิก และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจน โดย PGA ที่ผลิตได้จะไม่มีผลพลอยได้ที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ปนเปื้อนออกมาด้วย ส่วน Goto และ Kunioka (1992) ได้ศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ที่สุด และไม่พบพอลิแซ็กคาไรด์

Kubota และคณะ (1993b) ได้แยกแบคทีเรียจากดิน และนำมาทดสอบความสามารถในการผลิต γ -PGA โดยให้ปริมาณสูงสุด 50 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน และจัดจำแนกพบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* F-2-01 และเมื่อนำไปตรวจสอบกับ Fermentation Reserch Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Japan (FERMP-9082) โดยได้นำแบคทีเรียเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษากรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA โดยใช้กรดแอลกลูตามิก กรดดีกลูตามิก กรดแอลแอสพาร์ติก แอลอะลานีน แอลโลซีน แอลฟีนิลอะลานีน แอลฮีสทีดิน ซึ่งพบว่ากรดแอลกลูตามิกความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณ PGA สูงสุดที่ 48

กรัมต่อลิตร และในการตรวจทดสอบ PGA ด้วยชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) นั้นสามารถสรุปได้ว่ากรดแอลกลูตามิกมีความสำคัญต่อการผลิต PGA ของ *B. subtilis* F-2-01

นอกจาก *B. subtilis* IFO 3335 ที่แยกได้จากนัตโตะแล้วยังมีแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยอีกด้วย โดยจากการศึกษาของรัศมีกร สิงห์เจริญ (2544) ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่า อาหารหมักพื้นเมืองของทางภาคเหนือของไทยที่มีความคล้ายคลึงกับนัตโตะที่สามารถผลิต PGA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ ไอโซเลต RS 2 และยังมีการศึกษาภาวะ แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA โดยพบว่าไอโซเลต RS 2 สามารถเจริญได้ในอาหารสำหรับการผลิต PGA (อาหารสูตร PGA producing) ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีโซเดียมแอลกลูตาเมต ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ค่าความเป็นกรดเบส 6.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 200 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถผลิต PGA ได้ 8.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไอโซเลตดังกล่าวคือ *B. subtilis*

แบคทีเรียที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิต PGA

แบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถผลิต PGA จะเจริญภายใต้ภาวะที่มีอากาศและต้องการออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ใน วัฏจักรการสร้าง NAD(P)H รวมไปถึงการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นล้วนแต่มีความสำคัญต่อการผลิต PGA (Cromwick และคณะ, 1996)

Cheng และคณะ (1989) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตกรดอะมิโนภายใต้ภาวะที่ใช้ในการหายใจด้วยไนเตรต โดยได้คัดเลือก *B. licheniformis* A35 ซึ่งเป็น denitrifying bacterium และพบว่าสามารถผลิต γ -PGA ได้ 8.19 กรัมต่อลิตร และยังได้ศึกษาแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ฟรักโทส มอลโทส แลคโทส และ ซูโครส ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PGA สูงสุด คือ กลูโคส และมีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสูตร M นอกจากนี้ยังเป็นภาวะที่ไม่มีการเติมกรดแอลกลูตามิกอีกด้วย แสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* A35 สามารถผลิต PGA โดยไม่ต้องอาศัยกรดแอลกลูตามิก และในการผลิตครั้งนี้ก็ไม่พบผลพลอยได้หรือพอลิแซ็กคาไรด์

Ito และคณะ (1996) ได้แยก *B. subtilis* TAM-4 จากดิน พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการผลิต γ -PGA โดยได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกล็ดแอมโมเนียมและน้ำตาลต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนตามลำดับ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลูโคส ฟรักโทส กาแลคโทส แซ็กคาไรส แลคโทส มอลโทส โซโลส และ กลีเซอรอล พบว่าน้ำตาล

ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดและให้ปริมาณ PGA สูงถึง 22.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) เพปโตน กรดคาซามิโน และกรดแอลกลูตามิก จากการศึกษาพบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดเพราะให้ปริมาณ PGA 13.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะไม่มีกรดแอลกลูตามิกและแบคทีเรียก็ไม่ต้องการไบโอดีดินสำหรับการเจริญ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่นๆที่สามารถผลิต γ -PGA และไม่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อทดสอบด้วยวิธี Phenol-sulfuric พบว่ามีปริมาณน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อให้คงความสามารถในการผลิต PGA พบว่าจะต้องเก็บในอาหารแข็ง Trypticase soy แม้จะเก็บในอุณหภูมิห้องก็สามารถเก็บได้นาน

ภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PGA

ในการผลิต PGA ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้ปริมาณมากๆ จำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต นักวิจัยชาวเกาหลีได้คิดค้นวิธีการเลี้ยง *B. licheniformis* ATCC 9945A แบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร E ปริมาตร 950 มิลลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีอัตราการให้อากาศ 1,000 รอบต่อนาที โดยมีการเติมกรดอะซิติกด้วยอัตรา 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที และกรดแอลกลูตามิก 2.4 กรัมต่อลิตร พบว่าจากภาวะดังกล่าวสามารถผลิต PGA ได้สูงสุด 35 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิต 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Yoon และคณะ, 2000) และจากการศึกษาของ Cromwick และ Gross (1996) โดยใช้ *B. licheniformis* ATCC 9945A ในอาหารสูตร E เช่นเดียวกัน แต่เลี้ยงในภาวะแบบ โดยได้ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสของอาหารที่ใช้ในการผลิตและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต γ -PGA โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสดังนี้ 5.5, 6.5, 7.4 และ 8.25 รวมทั้งการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแอลกลูตามาตที่มีผลต่อการผลิต γ -PGA ซึ่งพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต γ -PGA คือ กรดซิทริกโดยมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.5 และมีอัตราการให้อากาศ 0.5-2.01 ลิตรต่อนาที โดยจะมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและให้ผลผลิต PGA ได้สูงสุด 15 กรัมต่อลิตร ส่วนการรายงานของ Ogawa และคณะ (1997) กล่าวว่าในการผลิต PGA ของ *B. subtilis* (natto) สายพันธุ์ MR-141 เมื่อเลี้ยงในถังหมักจาร์ (jar fermentor) ที่ความจุ 30 ลิตร และเลี้ยงในอาหารสูตร มอลโทส-ซีอิ๊วด้วเหลือง-กลูตาเมต (maltose-soysauce-glutamate; MSG) ปริมาตร 20 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีอัตราการให้อากาศ 400 รอบต่อนาที ให้การผลิตเท่ากับ 35 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ก็มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่เติมในอาหารยังเป็นสารป้องกันการเกิดฟองที่ดีอีก

ด้วย และจากการศึกษาของ Kubota และคณะ (1993b) ได้คัดเลือก *B. subtilis* F-2-01 จากดินที่มีความสามารถในการผลิต PGA โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสกลูตามิก 8 เปอร์เซ็นต์ เพปโตน 0.7 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.68 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนเตรด 0.5 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดฟอสเฟต 0.24 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.5 ภายใต้ภาวะการให้อากาศ เป็นเวลา 5 วัน โดยพบว่ามีการผลิต PGA ได้สูงสุด 50 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.4 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารและภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (ดัดแปลงจาก Shih และ Van, 2001)

สายพันธุ์	สูตรอาหาร	ภาวะ	การผลิต (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักโมเลกุล	อ้างอิง
<i>B. licheniformis</i> ATCC 9945	Glutamic acid (20 g/l) Glycerol (80 g/l) Citric acid (12 g/l) NH ₄ Cl (g/l)	30°C, 4 วัน	17-23	1.4x10 ⁵ -9.8x10 ⁵	Troy (1973) Cromwick และ Gross (1996)
<i>B. subtilis</i> IFO 3335	Glutamic acid (30 g/l) Citric acid(20 g/l)	37°C, 2 วัน	10-20	1.0x10 ⁵ -2.0x10 ⁶	Kunioka และ Goto (1994)
<i>B. subtilis</i> TAM-4	Fructose (75 g/l) NH ₄ Cl (18 g/l)	30°C, 4 วัน	20	6.0x10 ⁵ -1.6x10 ⁶	Ito และคณะ (1996)
<i>B. licheniformis</i> A35	Glucose (75 g/l) NH ₄ Cl (18 g/l)	30°C, 3-5 วัน	8-12	3.0-5.0x10 ⁵	Cheng และคณะ (1989)
<i>B. subtilis</i> F02-1	Glutamic acid (70 g/l) Glucose (1 g/l) Veal infusion broth (20 g/l)	30°C, 2-3 วัน	50	1.20x10 ⁶	Kubota และคณะ (1993a, b)
<i>B. subtilis</i> (natto)	Maltose (60 g/l) Soy sauce(70 g/l) Sodium glutamate (30 g/l)	40°C, 3-4 วัน	35	-	Ogawa และคณะ (1997)

และจากตารางที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีความสำคัญมากกับการสร้าง γ -PGA เพราะสายพันธุ์แบคทีเรียจะส่งผลต่อการใช้สารอาหารและภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง

รวมทั้งปริมาณ PGA ที่ผลิตได้ สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันก็มาจากแหล่งที่ตัดแยกที่ต่างกันด้วย โดยส่วนใหญ่แหล่งตัดแยกของแบคทีเรียที่น่าสนใจ คือ อาหาร โดยเฉพาะอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศต่างๆ เช่น นัตโตะของประเทศญี่ปุ่น chungkookjang ของประเทศเกาหลี kinema ของประเทศเนปาล และถั่วเน่าของประเทศไทย

การย่อยสลาย PGA

กระบวนการสังเคราะห์ PGA เป็นกระบวนการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ จึงไม่สามารถกำหนดความยาวของสายพอลิเมอร์หรือน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนได้ และในขณะที่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างก็มีความต้องการ PGA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันด้วย จึงมีการศึกษากระบวนการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของ PGA ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยพบว่านอกเหนือจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แล้วยังมีเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถจะย่อยสลาย PGA จึงก่อให้เกิดความสนใจเกี่ยวกับเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่น เอนไซม์ γ -polyglutamic acid hydrolase Tanaka และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการย่อยสลาย PGA โดยเอนไซม์ชนิดนี้ซึ่งผลิตจากราสายพันธุ์ *Myrothecium* sp. TM-4222 ส่งผลต่อพันธะ γ -glutamyl ของ PGA และเอนไซม์ชนิดนี้ยังทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งผลจากการย่อยสลายเมื่อตรวจด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าตรวจพบเฉพาะกรดแอลกลูตามิกที่ได้จากการย่อยสลายเท่านั้น

นอกจากนี้เอนไซม์ γ -polyglutamic acid hydrolase จะย่อยสลายได้ทั้ง PGA ที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิกทั้งชนิดดีและแอล ซึ่งก็จะส่งผลต่อการสร้าง PGA โดยจะทำให้พอลิเมอร์ที่สร้างขึ้นเป็นสายของเพปไทด์สั้นๆ แทน และเอนไซม์ PGA hydrolase ที่ผลิตได้จากรานี้เป็นชนิด endo-type specificity จากการเลี้ยงราในอาหารแข็งสูตร Czapek-Dox ที่มี PGA 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอนไซม์ที่สามารถจะย่อยสลาย PGA นอกจากจะผลิตได้จากเชื้อราแล้ว ยังพบว่าแบคทีเรียบางชนิดก็สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย PGA ได้ แต่เป็นเอนไซม์ชนิด exo-type specificity ซึ่งพบในแบคทีเรีย *Flavobacterium polyglutamicum* (Valcani และ Margallith, 1957) ที่ตัดแยกได้จากดิน โดยเลี้ยงแบคทีเรียใน อาหาร γ -polyglutamic acid hydrolase (PGAH) ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเติม PGA ที่มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *F. polyglutamicum* สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยสลาย PGA โดยเมื่อตรวจด้วยโครมาโทกราฟีชนิดกระดาษ และตรวจผลด้วยนินไฮดรินจะพบแถบของกรดกลูตามิกที่เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ และจากการศึกษาก็พบว่าภาวะที่

เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ อยู่ที่ช่วงอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบส 8.0-8.5 (Tanaka และคณะ, 1993)

การศึกษาเรื่องการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของ PGA ที่แบคทีเรียผลิตออกมาก็เพื่อจะเป็นข้อมูลถึงกลไกในการควบคุมให้ PGA ที่ผลิตออกมาได้ชนิดของโมเลกุลตามที่ต้องการเพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่นอนุพันธ์ทางยาที่จะต้องใช้ PGA เป็นตัวพา ยา ต้องการระดับโมเลกุลที่แตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ของแต่ละเนื้อเยื่อ และจากความรู้ก็จะนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิต PGA ในทางการค้าจึงจำเป็นที่จะต้องเรียนรู้การควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของ PGA โดยอาศัยกระบวนการต่างๆ เช่น การย่อยสลายด้วยภาวะเบส และการย่อยสลายด้วยอัลตราโซนิก (Shih และ Van, 2001)

การทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์โครงสร้างของ PGA

การผลิต PGA เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องผลิตให้ได้ปริมาณมาก และมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งก็เป็นที่ยอมรับอยู่แล้วว่า PGA ส่วนมากผลิตโดย *Bacillus* spp. จะหลั่งออกมานอกเซลล์ ดังนั้นจึงมีขั้นตอนการทำให้ PGA บริสุทธิ์ได้โดยการกรองและปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน สกัดแยก PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมเอทานอล เมทานอล หรือไอโซ โพรพานอล นอกจากนี้การทำให้ PGA บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นคือการกำจัดเกลือและสารปนเปื้อนโดยการไดอะลิซิส ซึ่งการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ PGA สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Goto และ Kunioka, 1992) การวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) (Yokoi และคณะ, 1995) การวิเคราะห์โครงสร้างด้วย Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) (Matsusaki และคณะ, 2002; Ye และคณะ, 2006) รวมทั้งการหาน้ำหนักโมเลกุลของ PGA ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Fumio และคณะ, 1996)

การประยุกต์ใช้ PGA ในด้านต่างๆ

1. การประยุกต์ใช้ในด้านทางการแพทย์

1.1 ตัวพา (Drug carrier) สารป้องกันเนื้องอกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันจะผลิตได้จากสารสกัดเนื้อไม้ของต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) ที่เรียกว่า Paclitaxel (Taxol, TXL) โดยจะต้านเนื้องอกที่เต้านมและรังไข่ แต่แทรกซอลจะมีปัญหาคือละลายน้ำได้ยาก จึงได้มีการศึกษาเพื่อ

หาสารชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นั่นคือ กรดพอลิกลูตามิกพาสิตแทกเซล (polyglutamic acid pacitaxel; PG-TXL) ที่เกิดจากการจับกันของ pacitaxel และกรดพอลิกลูตามิก ซึ่งมีสมบัติในการต้านมะเร็งเช่นเดียวกันแต่ TXL มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า จากการศึกษาของ Zou และคณะ (2001) พบว่าประสิทธิภาพของ poly (L)- glutamic acid camptothecin (PG-CPT) เมื่อใช้เป็นยาต้านมะเร็งปอด ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันของแคมป์โทเทซิน (CPT) กับกรดพอลิแอลกลูตามิกที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ในสภาพ phosphate-buffer saline โดยใช้ระยะเวลาในการศึกษา 50 วัน โดยในระหว่างการเชื่อมต่อกีจะปล่อย PG-CPT ปริมาณ 0.623 เปอร์เซ็นต์ 1.081 เปอร์เซ็นต์ และ 1.396 เปอร์เซ็นต์ ต่อวัน ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.3 7.4 และ 9.0 ตามลำดับ ซึ่ง PG-CPT ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติแต่จะมีผลต่อต้านเฉพาะเซลล์เนื้องอกเท่านั้น โดยจะให้ผลภายใน 32 วัน จึงสรุปได้ว่า PGA เป็นตัวพา CPT ที่ดีไปยังเนื้อเยื่อปอดเพื่อใช้ในการต้านเซลล์มะเร็งได้

1.2 กาวชีวภาพ (Biological adhesive) เป็นพอลิเมอร์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ จะทำให้เนื้อเยื่อเชื่อมติดกันหลังการผ่าตัดที่ โดยการควบคุมการไหลเวียนของเลือดและการปิดแผล กาวกึ่งสังเคราะห์ที่ผลิตขึ้นมาใช้ในการผ่าตัดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น ไซยาโนอะคริเลท (cyanoacrylate) ยูรีเทน พรีพอลิเมอร์ (urethane prepolymer) และ เจลาติน เรซอร์ซินอล ฟอร์มัลดีไฮด์ (gelatin-resorcinol-formaldehyde; GRF) แต่อย่างไรก็ตามกาวกึ่งสังเคราะห์ดังกล่าวก็มีข้อเสียหลายประการ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ อัตราการละลายต่ำ และทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังเนื่องจากในขณะที่กาวกึ่งสังเคราะห์ย่อยสลายสารที่ถูกปล่อยออกมาจะเป็นตัวกระตุ้นการต่อต้านของเนื้อเยื่อได้ (Toriumi, 1996)

กาวไฟบริน ที่ได้มาจากเลือดของมนุษย์ก็มีประสิทธิภาพในการเชื่อมเนื้อเยื่อต่ำ และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสสูง ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นหาสารชีวภาพชนิดใหม่ ที่มีประสิทธิภาพดีกว่ากาวชีวภาพหรือกาวสังเคราะห์ตามที่กล่าวมา ซึ่งกาวชีวภาพชนิดใหม่เกิดจากการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเคมีระหว่างเจลาตินและกรดพอลิแอลกลูตามิก ซึ่งสารทั้งสองชนิดสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการธรรมชาติได้ดี ในการนำไปใช้ พบว่าการเชื่อมต่อเนื้อเยื่อและการทำงานของระบบเลือดทำงานได้อย่างปกติ และสามารถนำไปใช้แทนกาวสังเคราะห์รวมทั้งกาวชีวภาพไฟบรินได้อย่างดี (Otani และคณะ, 1996a, b)

นอกจากนี้ เจลาติน-กรดพอลิแอลกลูตามิก ยังมีสมบัติที่น่าสนใจ คือ ละลายน้ำได้ดี โดยจะแปรสภาพไปอยู่ในรูปเจล แต่เจลที่ได้กลับมีพันธะที่แข็งแรงและมีความอ่อนนุ่มกับเนื้อเยื่อ ทั้งยังทำให้การทำงานของระบบเลือดเป็นปกติดีกว่ากาวชีวภาพไฟบรินอีกด้วย

2. การประยุกต์ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อม

2.1 สารตกตะกอนพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer flocculants) ในความหมายของ flocculants คือ สารที่ทำให้เกิดการตกตะกอน ซึ่งนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในด้านการบำบัดน้ำเสีย และในทางอุตสาหกรรม (Gutcho, 1977) จึงมีการแบ่งสารตกตะกอนชีวภาพออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. สารตกตะกอนชนิดอนินทรีย์ ได้แก่ อะลูมินัมซัลเฟต และพอลิอะลูมินัมคลอไรด์
2. สารตกตะกอนพอลิเมอร์ที่เกิดจากการสังเคราะห์สารอินทรีย์ ได้แก่ อนุพันธ์ของพอลิอะคริลาไมด์ กรดพอลิอะคริลิก และพอลิเอทิลีนเอมีน

3. สารตกตะกอนพอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ โคโคซาน อัลจิน และตะกอนจุลินทรีย์ สารตกตะกอนชนิดอนินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากราคาถูก และมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารดังกล่าวเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ ทำให้เกิดความเสียด้านสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายโดยกระบวนการชีวภาพ โดยเฉพาะอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นสารพิษต่อระบบประสาทและสารก่อมะเร็ง (Dearfield และ Abermathy, 1988)

จากนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มาใช้เป็นสารตกตะกอนแทน ซึ่งปัจจุบันก็ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย โดยนำไบโอพอลิเมอร์มาใช้เป็นสารตกตะกอนที่มีลักษณะคล้ายกับโปรตีน (Takeda และคณะ, 1992) พอลิแซ็กคาไรด์ และไกลโคโปรตีน (Lee และคณะ, 1995) ส่วนสารตกตะกอนอื่นๆก็ได้รับความนิยมเช่นกัน ได้แก่ กรดแกมมาพอลิกลูตามิก ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* IFO 3335 (Yokoi และคณะ, 1996)

2.2 สารจับโลหะหนักและสารกัมมันตภาพรังสี (Metal and radio nuclides binding) สารโลหะหนักและสารกัมมันตภาพรังสีที่ปะปนมากับดิน น้ำ และตะกอนดินล้วนแล้วแต่มีผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีนักวิจัยสนใจศึกษาหาวิธีในการกำจัดสารดังกล่าวให้หมดไป (Macaskie และ Basnakova, 1998) และจากการศึกษาของ Mclean และคณะ (1992) พบว่า *B. licheniformis* สามารถผลิต PGA ที่มีสมบัติเป็นสารที่มีประจุลบที่ช่วยในการจับโลหะหนักได้หลายชนิด เช่น Ni^{+2} Cu^{+2} Mn^{+2} และ Cr^{+3} ส่วนการใช้กรดแกมมาพอลิกลูตามิกในการจับกับ U^{+3} ก็อาศัยการฉายรังสีอินฟราเรดเข้ามาช่วยกระตุ้นการทำงานให้ดียิ่งขึ้น (He และคณะ, 2000) และจากการศึกษาของ Bhattacharyya และคณะ (1998) พบว่าแผ่นกรองโลหะหนักที่ผลิตจากกรดแกมมาพอลิกลูตามิกมีประสิทธิภาพต่อการกรอง พลวง แคลเดียม และนิกเกิล ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ก็ยังมีราคาถูก ซึ่งนับว่าเป็นทางเลือกที่ดีในการนำสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น

3. พลาสติกทนความร้อนและไฮโดรเจล (Thermoplastic and hydrogel)

ปัญหาขยับนับได้ว่าเป็นปัญหาใหญ่ในปัจจุบันนี้ และได้มีการให้ความสนใจกับการผลิตวัสดุที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ รวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้โดยกระบวนการตามธรรมชาติ เช่น ถุงพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยแสงอาทิตย์ และการใช้วัสดุดิบจากธรรมชาติในการผลิตภาชนะบรรจุอาหารแทนการใช้โฟม และการผลิตเส้นใยที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ เช่น การใช้กรดแกมมาพอลิกลูตามิก มาผลิตเส้นใยที่เป็นอนุพันธ์ของเอสเทอร์ และยังพบว่า γ -PGA ที่ศึกษาเป็นพลาสติกทนความร้อนอีกด้วย (Giannos และคณะ, 1990) นอกจากนี้กรดแกมมาพอลิกลูตามิกแอลฟาเบนซิลเอสเทอร์ที่ใช้ในการแปรรูปเส้นใยโดยผ่านกระบวนการผลิตที่ได้มาตรฐานจะได้ลักษณะของพลาสติกที่มีความแข็งแรงทนทาน ลักษณะโปร่งแสง และยืดหยุ่นได้ดี (Yahata และคณะ, 1992)

Choi และคณะ (1995) พบว่า *B. subtilis* IFO 3335 สามารถผลิต γ -PGA ซึ่งใช้เป็นไฮโดรเจล ที่เตรียมได้จากการฉายรังสีแกมมาสามารถดูดซับน้ำได้สูงมาก ไฮโดรเจลเป็นสารที่นิยมใช้กันมาในด้านการเกษตร ทางการแพทย์ เช่น ใช้สำหรับการเก็บกักน้ำสำหรับการเกษตร ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยา และใช้ทำตัวดูดซับน้ำในผ้าอ้อม โดยมีการพัฒนาสมบัติให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Park และ Hoffman, 1992)

4. การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

การถนอมอาหารที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายก็คือการแช่แข็ง แต่การนำอาหารแช่แข็งมาใช้ก็จะต้องหลอมละลายซึ่งนั่นก็จะส่งผลต่อเนื้อเยื่อ และสภาพอาหารเสียไป เนื่องจากไม่มีสารป้องกันการทำลายจากผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) สารป้องกันการทำลายจากผลึกน้ำแข็งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เช่น antifreeze protein (AFPs) ส่วนใหญ่จะผลิตจากกรดอะมิโนที่มีเกลียวเดี่ยวเป็นองค์ประกอบหลักในพันธะเปปไทด์ (Mitsuiki และคณะ, 1998)

การใช้ γ -PGA เป็นสารป้องกันการทำลายจากผลึกน้ำแข็ง ในการแช่แข็งอาหารจะส่งผลต่อรสชาติอาหารน้อยกว่าสารป้องกันการทำลายจากผลึกน้ำแข็งชนิดอื่นๆ ที่ใช้กันอยู่ทั่วไป เช่น แอ็กคาไรด์ เกลืออินทรีย์ และกรดอะมิโน (Tanimoto และคณะ, 1995)

นอกจากนี้ยังมีการนำ γ -PGA ใช้เป็นสารลดความชื้นของอาหาร (Sakai และคณะ, 2000) โดยจะเติมเข้าไปในอาหารที่มีรสขมต่างๆ เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ ควินิน คาเฟอีน และแร่ธาตุต่างๆ การเติม γ -PGA หรือเกลือที่สามารถรับประทานได้จะใช้กับอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เช่น อาหารที่ผลิตจากแป้งขนมอบ การผลิตก๋วยเตี๋ยว เพื่อเป็นการยืดอายุเก็บรักษา และทำให้คงสภาพของอาหารไว้ได้นานยิ่งขึ้น (Kunno และคณะ, 1988a, b) รวมไปถึงการใช้เป็นสารเพิ่มความชื้นในอาหารอีกด้วย (Yamanaka, 1991)

ปัจจุบันนักวิจัยกำลังให้ความสนใจเกี่ยวกับการศึกษา γ -PGA อย่างมาก โดยเฉพาะกระบวนการผลิตและกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวกับการผลิต รวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ในการผลิต ซึ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการผลิต γ -PGA พบว่าเมื่อเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันก็จะใช้องค์ประกอบอาหาร ภาวะ และกระบวนการในการผลิตต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อใช้เป็นข้อมูลและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป รวมทั้งต้องพัฒนาการผลิตโดยการใช้วัตถุดิบต้นทุนต่ำและเหลือใช้จากการเกษตร ทั้งยังเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)
- เครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรเฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis Apparatus) รุ่น Gelmate 2000 บริษัท Toyobo, Japan
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) รุ่น Gene Amp PCR system 2400 ของบริษัท Applied Biosystem, USA
- เครื่องอ่านเจล (Gel Reader) ของบริษัท Biorad, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น J 2-21 ของบริษัท Beckman, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อยแบบตั้งโต๊ะ (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- ตู้ความดันไอน้ำฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick scientific, USA
- ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U356 D ของบริษัท Sanyo, Japan
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cuberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybermatics, Singapore
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ระบบรีเวอร์สออสโมซิส รุ่น Option 3A ของบริษัท Elga, England
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, USA
- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-protein II Dual ของบริษัท Biorad, USA
- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502-P ของบริษัท PMC, USA
- ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ทริปโตเน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- แบคโตเพปโตเน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- กลูโคส ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Dramstadt,

Germany

- แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- ทริสมาเบส (Trisma base ; Tris-Hydroxymethyl-aminomethane) ($C_4H_{11}NO_3$) ของ

บริษัท Sigma, USA

- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, USA
- 95% เอทานอล ของบริษัท AlcoX
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท Merck, Dramstadt,

Germany

- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท

Sigma, USA

- Taq DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA
- Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
- โปรตีนเค (Proteinase K) ของบริษัท Qiagen, Germany
- ดีเอ็นทีพี (dNTP; Deoxynucleotidetriphosphate) ของบริษัท Promega, USA
- อะกาโรสเจล (Agarose gel) ของบริษัท IUI, Japan
- CTAB (Cetyl Trimethyl Amonium Bromide) ของบริษัท TCI-EP, Japan
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque,

Japan

- อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของบริษัท Sigma, USA
- N,N,N',N'-เตตระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED)

ของบริษัท Sigma, USA

- N,N'- เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-Methylene bis acrylamide) ของบริษัท Sigma,

USA

- แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ของบริษัท Sigma, USA
- ซูดปรตึนน้ำหนักโมเลกุล มาตรฐาน ของบริษัท Biorad, USA
- ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamylalcohol) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- เอทิลเดียมโบรไมด์ (EtBr) ของบริษัท Sigma, USA
- อะซีโตรไนไตรด์ (Acetonitrile) HPLC grade ของบริษัท Merck, Dramstadt,

Germany

- น้ำ HPLC grade ของบริษัท Lab-Scan, Thailand
- กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท Fluka,

Switzerland

- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck,

Darmstadt, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์

เก็บตัวอย่างอาหารหมัก ถั่วหมัก จากแหล่งต่างๆ แยกเชื้อจากตัวอย่าง โดยเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเกลือความเข้มข้น 0.85% และเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) นำไปปรมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเมือกเยิ้ม (Yoon และคณะ, 2000) จากนั้นคัดเลือกมาซัดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจานใหม่เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้บนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง LB เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับขวดเขย่า

3.2.1 นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB จนมีอายุ 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร อ้างอิงจาก Xu และคณะ (2005) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์โดยวิธีของ Goto และ Kunioka (1992) ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุด นำไบโอพอลิเมอร์มาทดสอบปริมาณน้ำตาลโดยวิธี Phenol-Sulphuric acid (Dubois และคณะ, 1956) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (Xu และคณะ, 2005) และทดสอบประมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951) โดยใช้โบไวน์ซีรัมอัลบูมินเป็นสารมาตรฐาน

3.2.1.1 ติดตามการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสออก เพื่อนำไปสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีกครั้ง นำน้ำใสที่ได้จากการล้างเซลล์รวมกับน้ำใสครั้งแรกเพื่อนำไปสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์ นำเซลล์ที่แยกได้ใส่ในถ้วยฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาพักในโถดูดความชื้นจนเย็นแล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.2.1.2 การสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์โดยวิธีของ Goto และ Kunioka (1992)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ในข้อ 3.2.1.1 มาตกตะกอนไบโอพอลิเมอร์ ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 4 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส ทั้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไบโอพอลิเมอร์ที่ตกตะกอนได้โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำไบโอพอลิเมอร์ที่ได้ทำไลโอไฟไลซ์ นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้งมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธี Phenol-Sulphuric acid method (Dubois และคณะ, 1956) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (Xu และคณะ, 2000)

นำไบโอพอลิเมอร์แห้งที่ผลิตได้ 1 มิลลิกรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครพิพพ์ เจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทดสอบปริมาณน้ำตาล โดยนำสารละลายของไบโอพอลิเมอร์ที่ได้ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5% 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 25-30 องศาเซลเซียส ที่มีการเขย่า เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาล เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0- 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยการนำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นผสม C (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นผสม D (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในอาหารเหลวกำหนดสูตรอ้างอิงจาก Xu และคณะ (2005) (ภาคผนวก ก)

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB จนมีอายุ 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในช่วง 0-6 ชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บทุกๆ 3 ชั่วโมง ติดตามการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์

ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์ (ตามวิธีข้อ 3.2.1.2) เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตามวิธีข้อ 3.2.1.1) นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาล (ตามวิธีข้อ 3.2.1.3) และโปรตีน (ตามวิธีข้อ 3.2.1.4)

3.4 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

3.4.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส มอลโตส กลิเซอรอล และตัวควบคุมโดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยใช้ความเข้มข้น 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.4.2 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 และ 6% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.4.3 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) และสารสกัดจากยีสต์ โดยปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนให้เท่ากับ 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200

รอบต่อหน้าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไปโอฟอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอฟอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.4.4 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการไบโอฟอลิเมอร์

ศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 แล้วแปรผันความเข้มข้นไนโตรเจนเป็น 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3 และ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไปโอฟอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอฟอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.4.5 การหาปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอฟอลิเมอร์

ศึกษาปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.3 และ 3.4.4 ตามลำดับ โดยแปรผันความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไปโอฟอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอฟอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตไบโอฟอลิเมอร์

3.5.1 การหาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอฟอลิเมอร์

ศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แปรผันค่าความเป็นกรดเบสเป็น 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.5.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แปรผันอุณหภูมิเป็น 25, 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ในปริมาณที่เหมาะสมและค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.5.3 การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 1, 3, 5, 7, 8 และ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ในปริมาณที่เหมาะสมและค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความขุ่นนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์ เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.5.4 การหาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.3 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ในปริมาณที่เหมาะสมและค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในช่วง 0-6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บทุกๆ 3 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอ

พอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความข้นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.5.5 การเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตในเวลาที่เหมาะสม

ศึกษาเวลาในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสม โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.3 ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมและค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันเวลาในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นสองเท่า ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดไบโอพอลิเมอร์ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความข้นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน

3.6 การผลิตไบโอพอลิเมอร์

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารที่ปรับปรุงสูตร (ภาคผนวก ค) และมีภาวะที่ปรับให้เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ตามที่ได้ผลในข้อ 3.4 และ 3.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสออก เพื่อนำไปสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์โดยวิธีของ Goto และ Kunioka (1992) ตามข้อ 3.2.2.2 แล้วนำสารไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.7 การทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์

นำไบโอพอลิเมอร์จากข้อ 3.6 ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร นำสารปนเปื้อนที่ไม่ละลายออกด้วยการปั่นแยกออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที กำจัดเกลือและสารโมเลกุลขนาดเล็กต่างๆออกจากสารละลายไบโอพอลิเมอร์โดยการไดอะลิซิสที่มีค่าการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 500 ดาลตัน ซ้ำมคินด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำกลั่นทุกๆ 4 ชั่วโมง นำสารมาทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีน นำสารละลายไบโอพอลิเมอร์ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนมาทำไลโอฟิลไลซ์

3.8 การวิเคราะห์ส่วนประกอบในไบโอพอลิเมอร์

3.8.1 การเตรียมไบโอพอลิเมอร์โดยการย่อยด้วยกรด

นำไบโอพอลิเมอร์บริสุทธิ์จากข้อ 3.7 ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์แมล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาการย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์แมล นำตะกอนเกลือออกด้วยการปั่นแยกออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

3.8.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย Analytical Thin Layer Chromatography

ในการทดลองใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 (บริษัท Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร) เป็นเฟสคงที่ โดยมีสารละลายบิวทานอลต่อกรดอะซิติกต่อน้ำ ในอัตราส่วน 3: 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 63: 37 (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข) เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำไบโอพอลิเมอร์ที่ย่อยด้วยกรดจากข้อ 3.8.1 มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยมีกรดแอลกลูตามิก โมโนโซเดียม กลูตาเมต แอลไลซีน แอลอะราจีนิน เป็นตัวควบคุมแล้วนำไปใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ 120 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5-6 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปจนเกือบสุดแผ่น (เหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร) จากนั้นนำแผ่น TLC มาฝั่งให้เฟสเคลื่อนที่ระเหยจนแห้ง จึงนำมาตรวจผล โดยการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายอะซีโตน (ภาคผนวก ข) นำแผ่น TLC ฝั่งให้แห้งอีกครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สังเกตแถบที่เกิดขึ้นแล้ววัดเพื่อหาค่า R_f

3.8.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำไบโอพอลิเมอร์ที่ย่อยด้วยกรดจากข้อ 3.8.1 มากรองผ่านเซลลูโลส อะซีเตท เมมเบรน ที่มีขนาดรูกรอง 0.02 มิลลิเมตร แล้วนำไปฉีด HPLC เพื่อตรวจหาปริมาณกรดแอลกลูตามิกและกลูตาเมต ซึ่งภาวะ HPLC มีส่วนประกอบดังนี้

คอลัมน์ (Column)	pWell C18
ตัวละลาย (Mobile phase)	A คือ 0.1% กรดไทโรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ในน้ำกลั่น B คือ 100 % อะซีโตนไนโตร + 0.1% กรดไทโรฟลูออโรอะซิติก (TFA)
อัตราการไหล (Flow rate)	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิคอลัมน์	95 องศาเซลเซียส
ตัวตรวจผล (Detector)	ELSD
ปริมาตรสารที่ฉีด	20 ไมโครลิตร

นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกรดแอลกลูตามิกและกลูตามेटโดยใช้กราฟของกรดแอลกลูตามิกและโมโนโซเดียมกลูตามेटเป็นกราฟมาตรฐาน

3.9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Yamaguchi และคณะ (1996)

นำไบโอพอลิเมอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.7 เจือจางจนได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3 x 10.2 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้างประกบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล จากนั้นเทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 8% (ภาคผนวก ข) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้จน เจลแข็งตัว ชับน้ำออกให้หมด แล้วจึงเทสารละลายผสมสแตคกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 % (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) เติมน้ำอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำสารละลายไบโอพอลิเมอร์ที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่ใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข) ต้มในน้ำเดือด 45 นาที แล้วหยอดสารละลายไบโอพอลิเมอร์ 5 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐานซึ่งเป็น Prestained SDS-PAGE standard 5 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้จนถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและย้อมสีโปรตีน (dye staining) (ภาคผนวก ข) โดยใช้สีเมทิลีนบลู โดยการนำเจลไปแช่ในน้ำย้อมสี (staining solution) (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์โดยพิจารณาจากการเคลื่อนที่ของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.10 การวิเคราะห์โครงสร้างของไบโอพอลิเมอร์โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

นำไบโอพอลิเมอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.7 มาวิเคราะห์ด้วย FT-IR ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11 การวิเคราะห์ชนิดประจุของไบโอพอลิเมอร์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำไบโอพอลิเมอร์จากข้อ 3.7 มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์แมล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) ด้วยอัตราส่วน 2-3 เท่าของสารละลายไบโอพอลิเมอร์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตตะกอนในสารละลาย ถ้าเกิดตะกอนในสารละลายแสดงว่าไบโอพอลิเมอร์มีสมบัติเป็นประจุลบ (acidic biopolymer)

3.12 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ทางอนุกรมวิธาน

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไบโอพอลิเมอร์สูงสุดจากข้อ 3.2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

3.12.1 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา (morphological and physiological characteristics) การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical characteristics) อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

3.12.1.1 การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง LB โดยสังเกตลักษณะและสีของโคโลนี เมื่อป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งศึกษาลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง วัฒนธรรมของเซลล์ด้วยไมโครมิเตอร์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ

3.12.1.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเชื้อลงในอาหารต่างๆ เพื่อทดสอบสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ ต่อไปนี้

- Carbohydrate fermentation
- Catalase test
- Oxidase test
- Motility
- Casein hydrolysis
- Gelatin hydrolysis
- Starch hydrolysis
- Egg Yolk hydrolysis
- Esculin hydrolysis
- Tween 20 hydrolysis
- ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ nitrate reductase
- ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียม

คลอไรด์

- ทดสอบหา Methyl red (MR)
- ทดสอบ Voges-Proskauer (VP)
- ทดสอบการใช้ Citrate
- ทดสอบการใช้ Propionate

เปรียบเทียบผลการทดสอบทางชีวเคมีกับ *Bacillus subtilis*

MSCU0167 จาก Microbial culture collection ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest และคณะ, 1987)

3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

3.12.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิพจันนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมโปรตีนเนส

เค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และ Lysis buffer I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้ายผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้น ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครพิพิจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่หลอดไมโครพิพิจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส

3.12.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(Polymerase Chain Reaction; PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.12.2.1 โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 Forward primer 27f 5'-AGTTTGATCATGGCTC-3'

ไพรเมอร์คู่ที่ 2 Reverse primer 1522r 5'-CCATTGTAGCACGTGT-3'

ในปฏิกิริยา PCR มีส่วนผสมสาร ความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวสำหรับการเพิ่มปริมาณ 16S ribosomal DNA ของแบคทีเรียที่ คัดเลือกที่สกัดได้ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
MgCl	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10x	5	1x
ไพรเมอร์ 27f	50 μ M	0.5	1.0 μ M
ไพรเมอร์ 1522r	50 μ M	0.5	1.0 μ M
dNTPs	10 mM	1	200 μ M
Taq DNA polymerase	5 U/ μ	0.5	2.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ (template)	1 pg-1 μ g/ μ	1	1 pg-1 μ g
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		38.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

ตั้งโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้

Hot start	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Extention	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Final extention	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

ดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำโดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1xTAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ (Chamber) เทบัฟเฟอร์ 1xTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสปีดิตตาม ให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 1 เท่า โดยอาจปรับ

ปริมาณด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาณของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทั้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาสุดของบออะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.12.2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่งไปหาลำดับที่ห้องหุ่นส่วนจำกัด วอร์ด เมติก โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้คือ forward primer 27f และ reverse primer 152r นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ประมาณ 1,457 bp มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GeneBank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เปรียบเห็นถึงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S r DNA ที่ได้ จะนำมาใช้ในการจำแนกของชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอฟอสฟอไรต์

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักและถั่วหมักจากแหล่งต่างๆ โดยนำสารละลายตัวอย่างมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการสร้างเมือกเยิ้มบนผิวโคโลนี (Yoon และคณะ, 2000) พบว่า จากตัวอย่างอาหารหมัก ถั่วหมักจากแหล่งต่างๆ ทั้งหมด 102 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเมือกได้ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก ถั่วหมักจากแหล่งต่างๆ

ลำดับ	ตัวอย่างอาหารหมัก ถั่วหมัก	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม	ไอโซเลต
1.	พริกบด	ตลาดบางซื่อ กรุงเทพฯ	1	BA1
2.	กระเทียมดอง	"	1	BA5
3.	เต้าหู้ยี้	"	2	BA13-0-1, BA13-0-2
4.	ปลาต้ม-2	"	1	BA15-2
5.	พริกเผา	"	2	SR 4-1,SR 4-2
6.	หน่อไม้ดอง	"	1	SR 5
7.	ปลาร้า	ตลาดราชวัตร กรุงเทพฯ	2	RA1-2-1, RA1-2-2
8.	เต้าเจี้ยว-1	"	1	RA 2-1
9.	เต้าเจี้ยว-2	"	1	RA 2-2
10.	พริกแกงเผ็ด	"	1	RA 7
11.	พริกแกงโตปลา	"	2	RA9-0-1, RA9-0-2
12.	โตปลา	"	1	RA 10
13.	แหนม	"	1	MM-6
14.	เต้าเจี้ยว	"	1	MM-14
15.	หน่อไม้ดอง	"	1	MN-1

16.	ผักหนามดอง	ตลาดแม่กลอง สมุทรสาคร	1	MK-2
17.	ปลาจ่อม	..	1	MK-3
18.	น้ำพริกแกง	..	1	MK-4
19.	ผักเสี้ยนดอง	..	1	MK-8
20.	ผักนางนุนดอง	..	1	MK-9
21.	เต้าเจี้ยว-2	..	1	MK-10
22.	เต้าหู้ยี้	..	1	MK-12
23.	ชิงดอง	..	1	MK-13

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเมือกเยิ้มบนผิวโคโลนี ทั้ง 28 สายพันธุ์ มาเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์เพื่อนำหนักเซลล์แห้งและนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมาสกัดแยกไบโอพอลิเมอร์ และเมื่อติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยสังเกตจากความข้นหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างเมือกบนผิวโคโลนีมี สายพันธุ์ที่ให้ความข้นหนืดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยแสดงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้งก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 4.8 พบว่าหลังการเลี้ยงเชื้อนอกจากความข้นหนืดของอาหารจะเพิ่มขึ้นแล้ว ความขุ่นและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อก็ยิ่งเปลี่ยนไปด้วย

ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไบโอพอลิเมอร์ของแบคทีเรียทั้ง 28 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกำหนดสูตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลำดับ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนักไบโอพอลิ เมอร์ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง
1.	BA 1	3.108	5.052	1.625
2.	BA 5	3.716	2.976	0.801
3.	BA 13-0-1	1.188	3.549	2.987
4.	BA 13-0-2	3.848	1.932	0.502

5.	BA 15-2	6.872	3.052	0.444
6.	SR 4-1	4.768	5.320	1.116
7.	SR 4-2	1.852	4.220	2.279
8.	SR 5	3.054	2.372	0.777
9.	RA 1-2-1	2.520	1.972	0.783
10.	RA 1-2-2	1.272	1.732	1.362
11.	RA 2-1	4.976	5.015	1.008
12.	RA 2-2	4.480	1.612	0.386
13.	RA 6	3.772	3.476	0.922
14.	RA 7	1.812	2.616	1.444
15.	RA 9-0-1	3.864	3.012	0.779
16.	RA 9-0-2	3.468	5.428	1.565
17.	RA 10	3.736	1.392	0.372
18.	MM-6	3.448	0	0
19.	MM-14	3.640	2.846	0.782
20.	MN-1	2.44	1.252	0.513
21.	MK-2	2.120	2.480	1.169
22.	MK-3	4.924	1.516	0.307
23.	MK-4	5.452	1.837	0.337
24.	MK-8	3.632	2.372	0.653
25.	MK-9	4.008	1.352	0.337
26.	MK-10	2.988	1.420	0.475
27.	MK-12	3.732	1.088	0.292
28.	MK-30	4.132	2.604	0.630



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ

4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์สูงสุดในระดับขวดเขย่า

คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ปริมาณสูงทั้งหมด 4 สายพันธุ์นำมาเลี้ยงในอาหารกำหนดสูตร ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซ้ำอีกครั้งโดยติดตามการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (NT2) ที่แยกได้จากถั่วหมักนัตโตะ ประเทศญี่ปุ่น แสดงผลในตารางที่ 4.8 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ปริมาณสูงใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ NT2 ที่ใช้ในการทำนัตโตะ จึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ใช้ในการทดลองต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไบโอฟอสฟอไรต์ที่แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่สามารถผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกำหนดสูตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลำดับ	สายพันธุ์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักไบโอฟอสฟอไรต์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของน้ำหนัก ไบโอฟอสฟอไรต์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
1.	BA 1	2.739	4.823	1.761
2.	BA13-0-1	1.776	4.927	2.774
3.	SR4.2	1.634	2.893	1.770
4.	RA9-0-2	3.773	4.933	1.307
5.	NT 2*	2.218	6.238	2.812

หมายเหตุ * คือ *Bacillus subtilis* natto (NT2) ที่แยกได้จากถั่วมักนัตโตะ ประเทศญี่ปุ่น

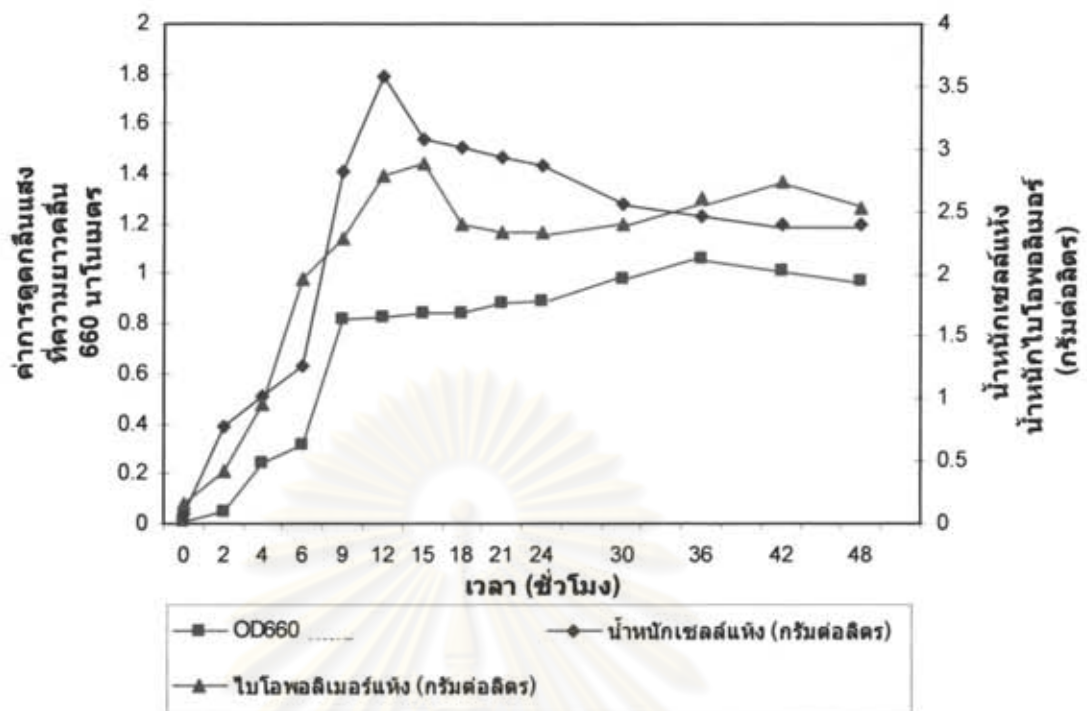
4.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอฟอสฟอไรต์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอฟอสฟอไรต์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้คือ BA 13-0-1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภาวะเขย่าขวดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในช่วง 0-6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บทุกๆ 3 และ 6 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง เนื่องจากลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังการเลี้ยงเชื้อจะมีสีขาวขุ่นจากไบโอฟอสฟอไรต์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรในการติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมาสกัดแยกไบโอฟอสฟอไรต์และหาน้ำหนักแห้งหลังการทำไลโอฟิลไลซ์ ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1

เวลา (ชั่วโมง)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของน้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
0	0.012	0.074	0.163	2.203
2	0.049	0.776	0.414	0.534
4	0.245	1.019	0.949	0.931
6	0.315	1.265	1.962	1.551
9	0.815	2.810	2.277	0.810
12	0.827	3.582	2.789	0.779
15	0.839	3.080	2.876	0.934
18	0.845	3.012	2.389	0.793
21	0.881	2.930	2.332	0.796
24	0.888	2.870	2.338	0.815
30	0.977	2.560	2.400	0.938
36	1.060	2.469	2.600	1.053
42	1.014	2.400	2.740	1.142
48	0.972	2.400	2.530	1.054

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 และการผลิตไบโอพอลิเมอร์

จากรูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 และการผลิตไบโอพอลิเมอร์พบว่า จากการติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าชั่วโมงที่ 9-12 แบคทีเรียมีการเจริญสูงสุด และในขณะเดียวกันการผลิตไบโอพอลิเมอร์โดยติดตามจากการน้ำหนักแห้งของไบโอพอลิเมอร์ก็พบว่าปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 15 จากนั้นก็มีปริมาณลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 42 เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์พบว่า ไบโอพอลิเมอร์เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญ และแม้ว่าอัตราการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในชั่วโมงที่ 15 จะมีปริมาณสูงสุดถึง 2.876 กรัมต่อลิตรแต่ก็มีปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงเช่นกัน โดยสูงถึง 3.080 กรัมต่อลิตร ทำให้มีอัตราส่วนระหว่างไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.934 นอกจากนี้ในการปั่นแยกเซลล์ในชั่วโมงที่ 15 ทำได้ยากส่งผลให้ต้องเพิ่มการเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อรวมทั้งเพิ่มปริมาณเอทานอลในการตกตะกอนอีกด้วย และเมื่อพิจารณาชั่วโมงที่ 42 ซึ่งมีปริมาณการผลิตไบโอพอลิเมอร์ที่ใกล้เคียงกัน คือ 2.740 กรัมต่อลิตรแต่กลับมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า คือ 2.400 กรัมต่อลิตร ทำให้มีอัตราส่วนระหว่างไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.142 และสามารถปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ง่ายกว่าชั่วโมงที่

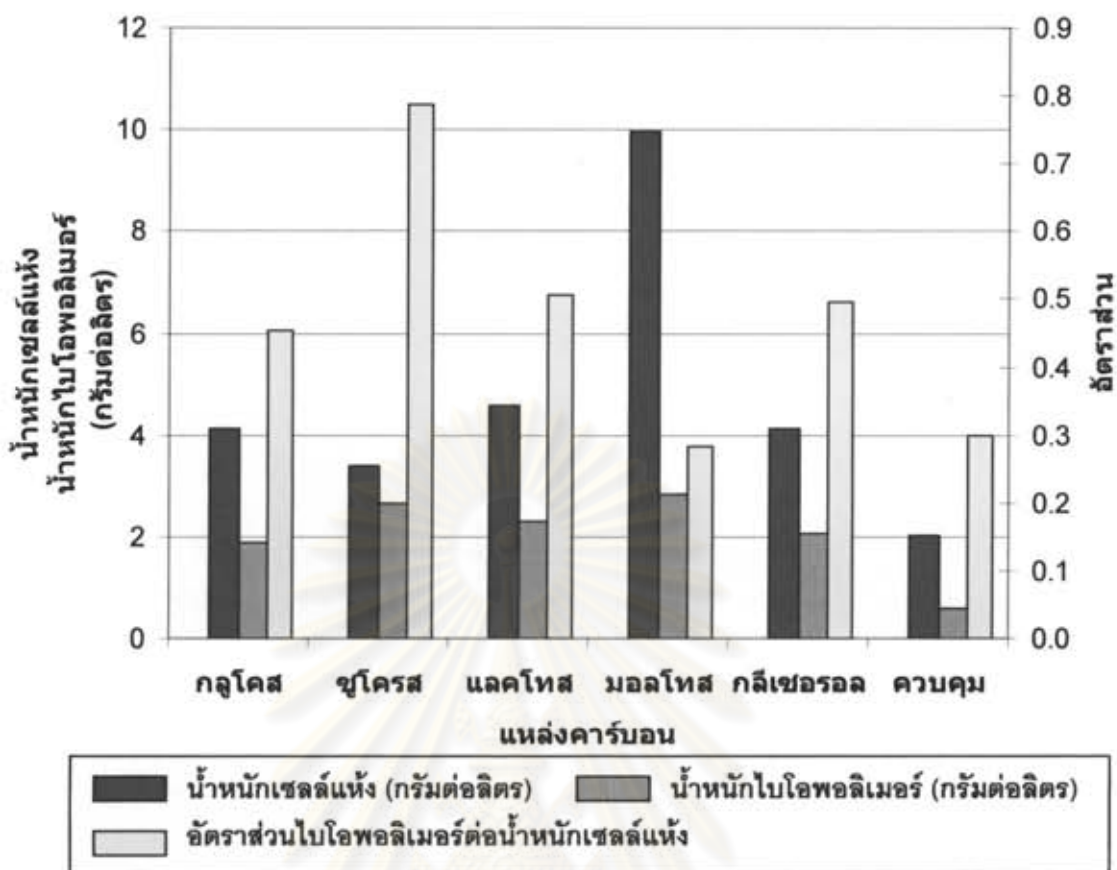
15 ดังนั้นผู้ทดลองจึงเลือกเวลาชั่วโมงที่ 42 เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในการทดลองต่อไป

4.5 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

การแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโทส มอลโทส กลีเซอรอล และอาหารเหลวควบคุมโดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยใช้ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 2.671 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของซูโครสซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.787 ร่วมด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ผลการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์

แหล่งคาร์บอน (3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
กลูโคส	1.646	4.122	1.872	0.454
ซูโครส	1.530	3.392	2.671	0.787
แลคโทส	1.684	4.575	2.315	0.506
มอลโทส	1.409	9.961	2.831	0.284
กลีเซอรอล	1.490	4.141	2.057	0.497
ควบคุม	1.458	2.012	0.603	0.299



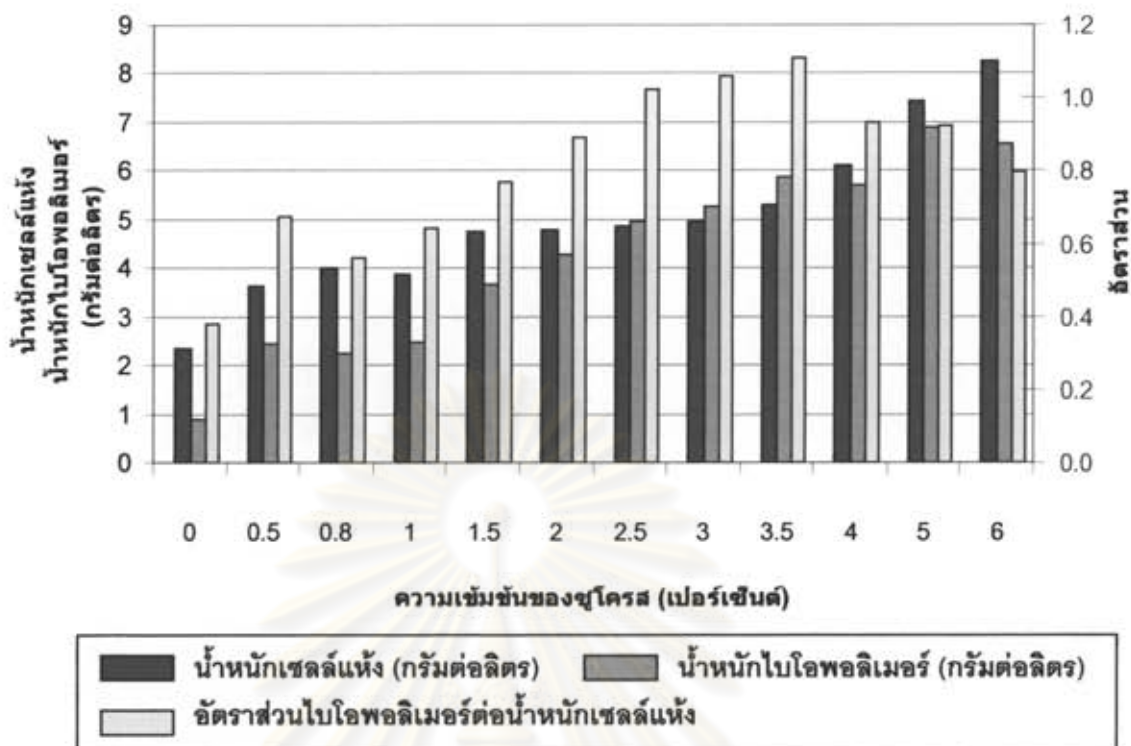
รูปที่ 4.10 กราฟแสดงน้ำหนักเซลลแห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลลแห้งจากการแปรผันแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0-6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ของซูโครส เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้เท่ากับ 5.887 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.110 ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ความเข้มข้นของซูโครส (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
0	1.453	2.346	0.894	0.381
0.5	1.532	3.631	2.443	0.673
0.8	1.686	4.002	2.250	0.562
1.0	1.772	3.867	2.479	0.641
1.5	1.704	4.758	3.664	0.770
2.0	1.683	4.804	4.283	0.892
2.5	1.643	4.855	4.965	1.023
3.0	1.548	4.959	5.261	1.061
3.5	1.55	5.302	5.887	1.110
4.0	1.512	6.117	5.707	0.933
5.0	1.395	7.452	6.900	0.926
6.0	1.387	8.244	6.570	0.797

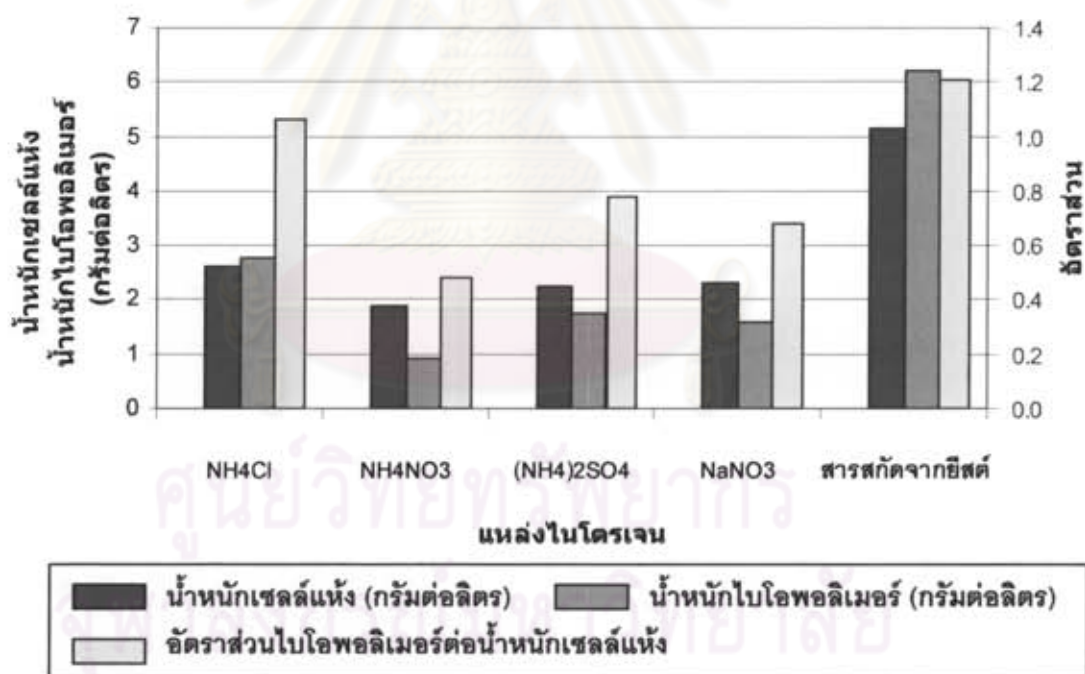


รูปที่ 4.11 กราฟแสดงน้ำหนักยูเรียแห้ง น้ำหนักไนโตรเจนแห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไนโตรเจนต่อน้ำหนักยูเรียแห้งจากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) และสารสกัดจากยีสต์ โดยปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนให้เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้สูงเท่ากับ 6.201 กรัมต่อลิตรในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มียูเรียความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และมีอัตราส่วนของน้ำหนักไนโตรเจนต่อน้ำหนักยูเรียแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.208 ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์

แหล่งไนโตรเจน (0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
NH ₄ Cl	1.501	2.612	2.776	1.063
NH ₄ NO ₃	1.621	1.889	0.909	0.481
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.566	2.240	1.746	0.779
NaNO ₃	1.606	2.327	1.580	0.679
สารสกัดจากยีสต์	1.904	5.135	6.201	1.208



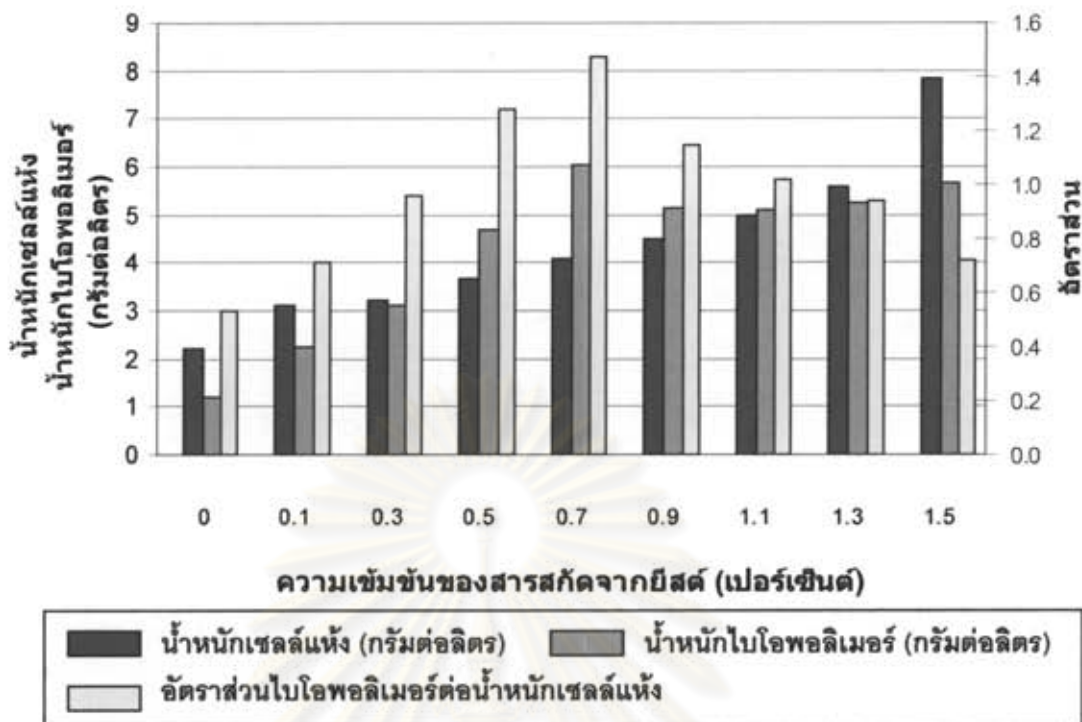
รูปที่ 4.12 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันแหล่งไนโตรเจน

และการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เป็น 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3 และ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อลิตร) ให้ค่าน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.032 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.474 ดังแสดงในตารางที่ 4.13 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ความเข้มข้นของ สารสกัดยีสต์ (เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อ ปริมาตร)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
0	1.541	2.212	1.184	0.535
0.1	1.587	3.122	2.232	0.715
0.3	1.632	3.216	3.094	0.962
0.5	1.982	3.678	4.704	1.279
0.7	1.821	4.092	6.032	1.474
0.9	1.957	4.484	5.148	1.148
1.1	2.013	4.980	5.087	1.021
1.3	1.934	5.590	5.245	0.938
1.5	2.102	7.851	5.647	0.719

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

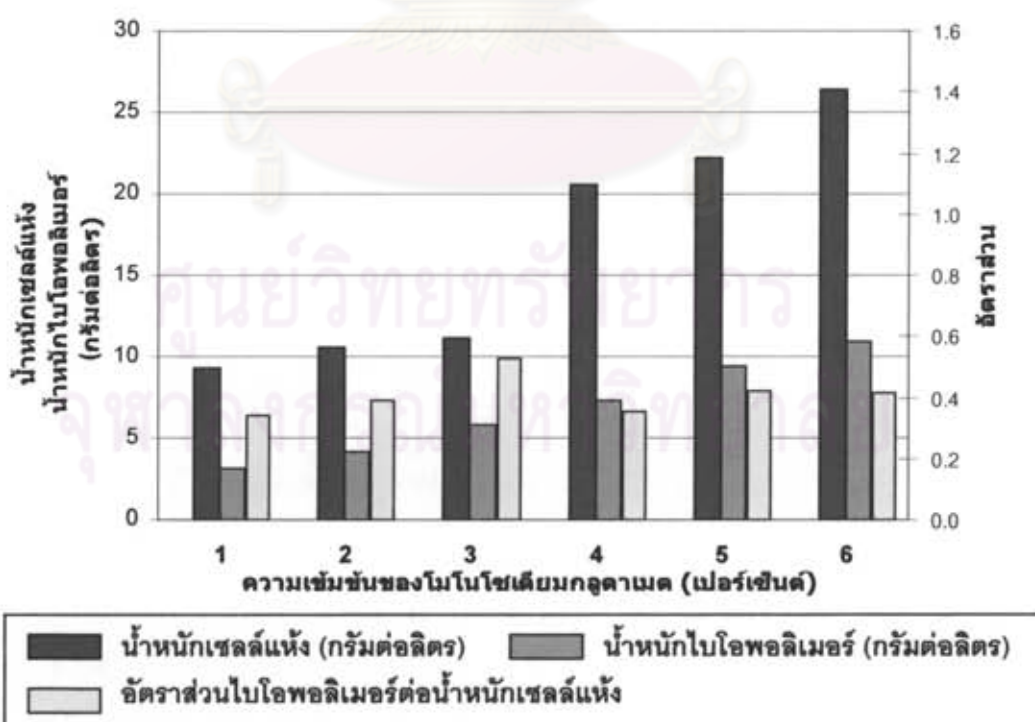


รูปที่ 4.13 กราฟแสดงน้ำหนักรีดแห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรีดแห้งจากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ในการศึกษาปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือซูโครสและสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 3.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ โดยแปรผันความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ค่าน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้งเท่ากับ 5.837 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.14 และมีอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักรีดแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.525 ดังแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลการแปรผันความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ความเข้มข้นของ โมโนโซเดียม กลูตาเมต (เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อ ปริมาตร)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
1	1.655	9.247	3.173	0.343
2	1.599	10.529	4.141	0.393
3	1.603	11.119	5.837	0.525
4	1.649	20.589	7.318	0.355
5	1.639	22.193	9.388	0.423
6	1.660	26.341	10.896	0.414



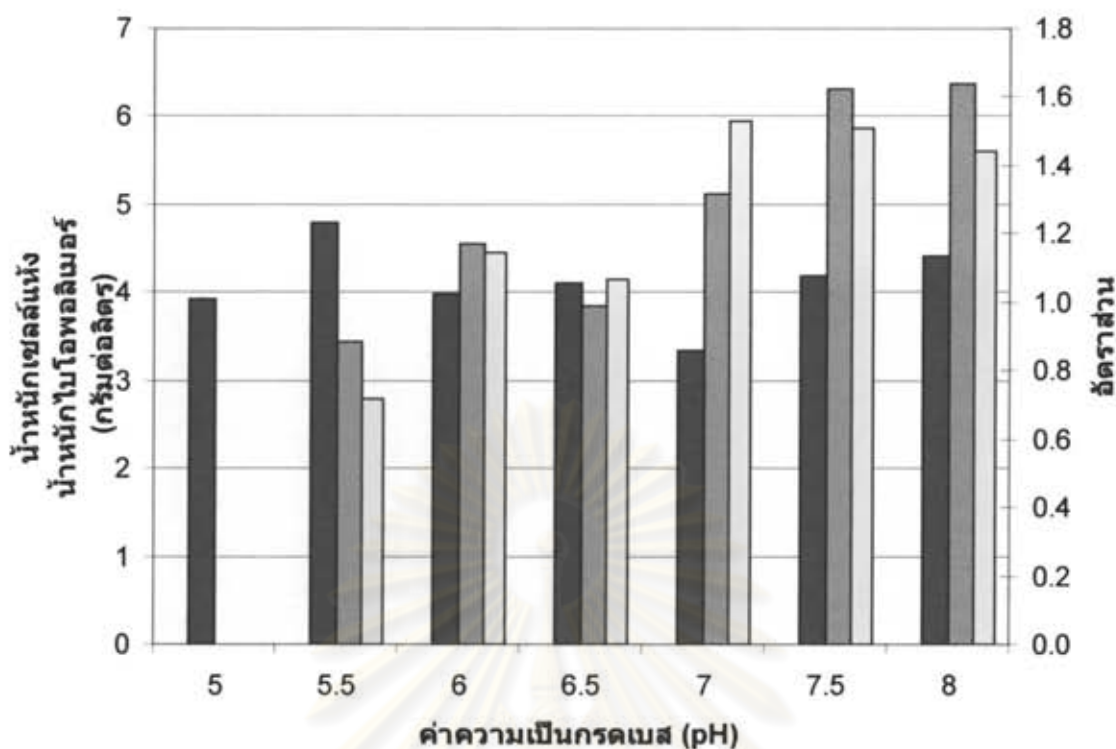
รูปที่ 4.14 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมต

4.6 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์

ศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ที่แปรผันค่าความเป็นกรดเบสเป็น 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ในปริมาณที่เหมาะสมเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ค่าความเป็นกรดเบสที่ 7.5 จะให้ปริมาณในการผลิตไบโอพอลิเมอร์เท่ากับ 6.319 กรัมต่อลิตรและมีอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.511 ดังแสดงผลในตารางที่ 4.15 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ค่าความเป็นกรดเบส	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
5.0	1.743	3.929	0	0
5.5	7.706	4.791	3.441	0.718
6.0	1.605	3.995	4.561	1.142
6.5	1.648	4.103	3.847	0.938
7.0	1.602	3.342	5.113	1.530
7.5	1.663	4.181	6.319	1.511
8.0	1.712	4.420	6.378	1.443

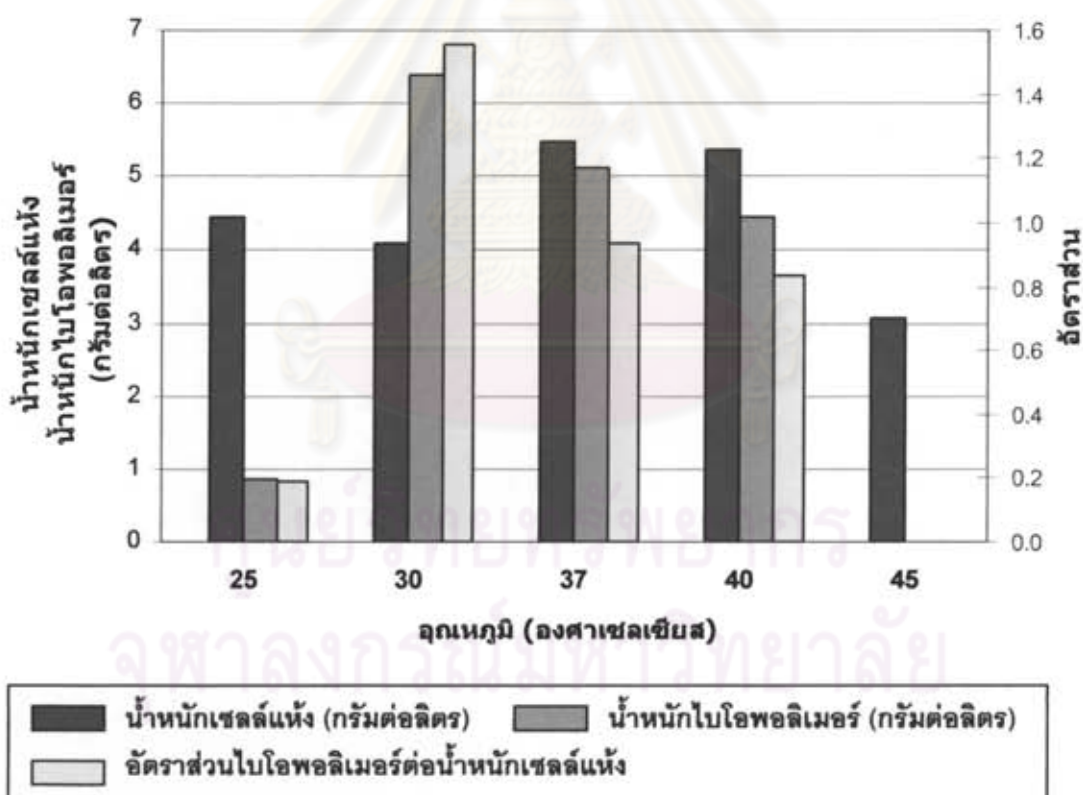


รูปที่ 4.15 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักโพลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักโพลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันค่าความเป็นกรดเบส

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ไนปริมาณที่เหมาะสมและค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสม ที่แปรผันอุณหภูมิเป็น 25, 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะให้ปริมาณในการผลิตไบโอพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 6.378 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของน้ำหนักโพลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.554 นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ดังแสดงผลในตารางที่ 4.16 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
25	1.656	4.467	0.847	0.189
30	1.654	4.103	6.378	1.554
37	1.867	5.467	5.113	0.935
40	1.836	5.354	4.467	0.834
45	1.254	3.082	0	0



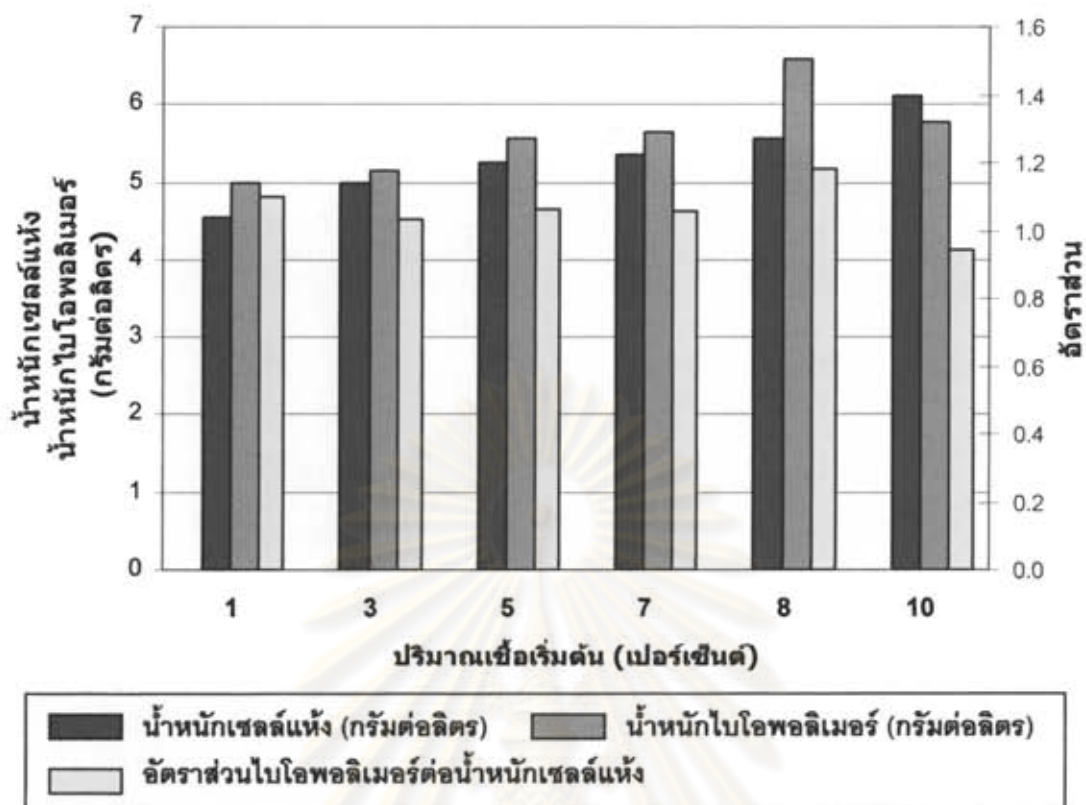
รูปที่ 4.16 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันอุณหภูมิ

และศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ที่แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 1, 3, 5, 7, 8 และ 10 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ในปริมาณที่เหมาะสมและค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมพบว่าเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 8 เพอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณในการผลิตไบโอพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 6.586 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.182 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
1	1.964	4.537	4.980	1.098
3	1.944	4.987	5.141	1.031
5	1.957	5.240	5.573	1.064
7	1.925	5.354	5.653	1.056
8	1.895	5.574	6.586	1.182
10	1.915	6.102	5.770	0.946

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



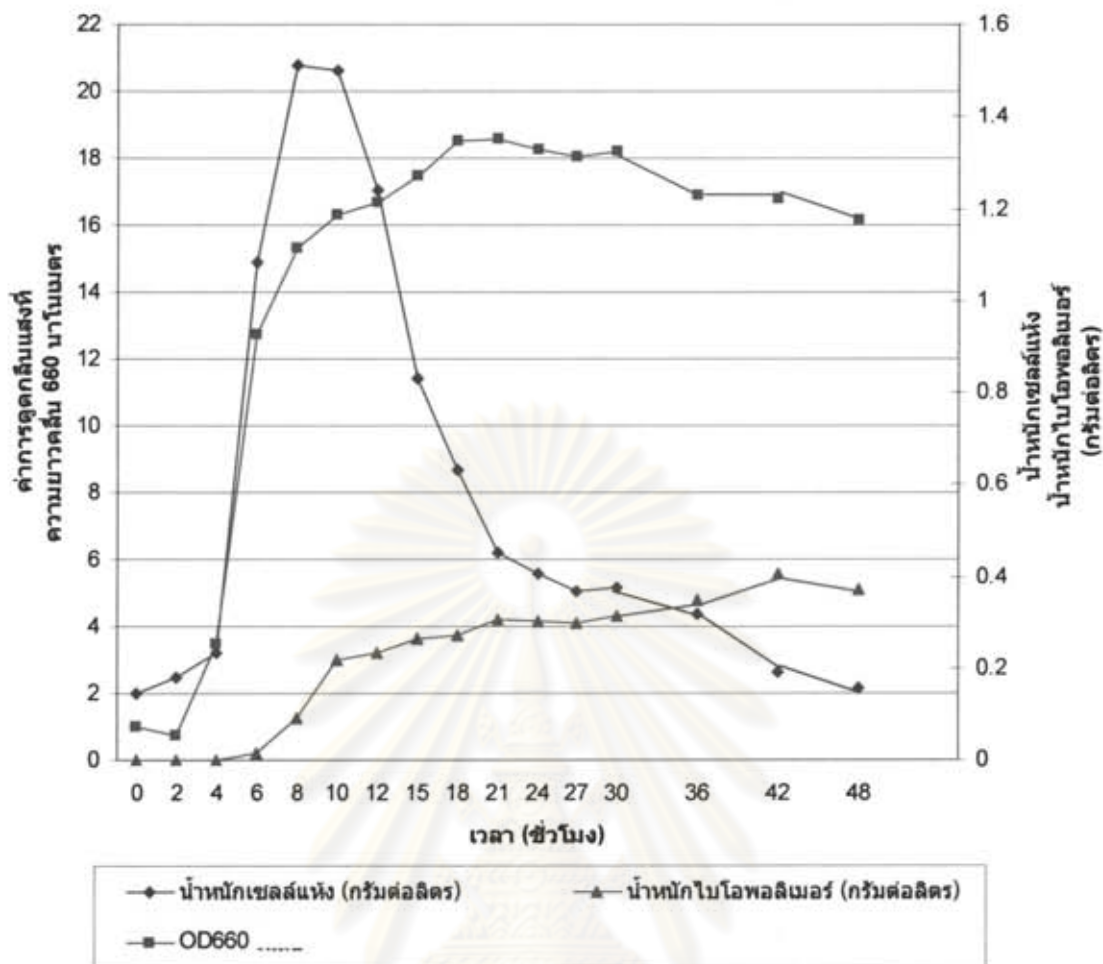
รูปที่ 4.17 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และในการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน ปริมาณที่เหมาะสมในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยในช่วง 0-6 ชั่วโมง เก็บ ตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บทุกๆ 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 42 ชั่วโมง จะให้ค่าการผลิตไบโอ พอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 5.553 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.097 ดังแสดงในตารางที่ 4.18 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

เวลา (ชั่วโมง)	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
0	0.074	1.988	0	0
2	0.054	2.477	0	0
4	0.253	3.214	0	0
6	0.926	14.89	0.224	0.015
8	1.112	20.774	1.287	0.062
10	1.187	20.606	2.991	0.1145
12	1.212	17.057	3.233	0.189
15	1.271	11.437	3.645	0.319
18	1.347	8.697	3.733	0.429
21	1.351	6.212	4.233	0.681
24	1.327	5.558	4.181	0.752
27	1.313	5.057	4.098	0.810
30	1.326	5.132	4.299	0.838
36	1.229	4.352	4.767	1.095
42	1.222	2.652	5.553	2.094
48	1.174	2.145	5.103	2.379



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และการผลิตโพลิเอทิลีนโกล์หลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

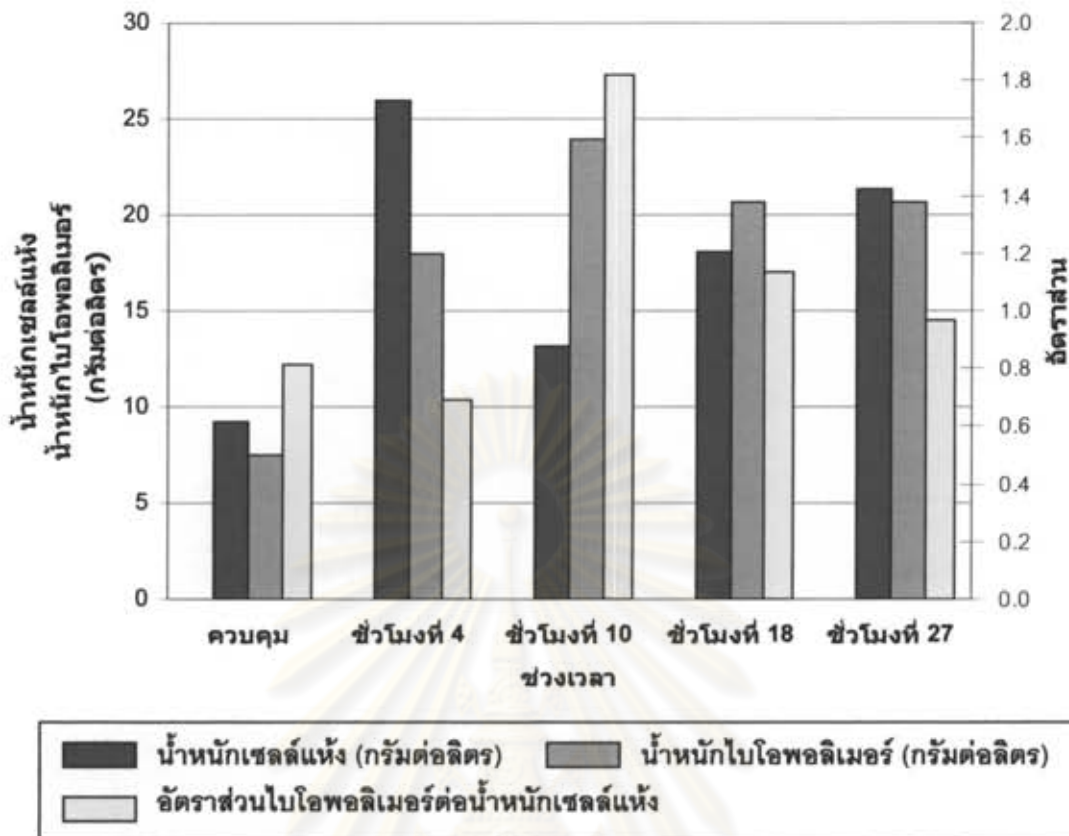
การศึกษาเวลาที่เหมาะสม ในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ในปริมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือซูโครสและสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 3.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ และมีโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วย โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันเวลาในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต คือที่เวลาชั่วโมงที่ 4 ชั่วโมงที่ 10 ชั่วโมงที่ 18 และชั่วโมงที่ 27 เทียบกับตัวควบคุม คือไม่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตระหว่างการเจริญของเชื้อ พบว่าเมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นสองเท่าเวลาที่ 10 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 จะผลิตโพลิเอทิลีนโกล์ได้ในปริมาณสูงสุด คือ 23.921 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของน้ำหนักโพลิเอทิลีนโกล์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด

เท่ากับ 1.819 ซึ่งมากกว่าอัตราการผลิตเดิมถึง 4 เท่า ดังแสดงผลในตารางที่ 4.19 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์

เวลาในการเติม โมโนโซเดียมกลูตาเมต	OD660	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์แห้ง (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของ น้ำหนัก ไบโอพอลิเมอร์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง
ควบคุม	1.672	9.256	7.521	0.813
ชั่วโมงที่ 4	1.787	25.953	17.969	0.692
ชั่วโมงที่ 10	1.696	13.149	23.921	1.819
ชั่วโมงที่ 18	1.767	18.117	20.660	1.137
ชั่วโมงที่ 27	1.809	21.364	20.644	0.966

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักไบโอพอลิเมอร์แห้ง และอัตราส่วนของน้ำหนักไบโอพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากการแปรผันช่วงเวลาในการเติมโมโนเดียมกลูตาเมต

4.7 การผลิต การสกัดและการทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์

การผลิตไบโอพอลิเมอร์จาก แบคทีเรียที่คัดแยกได้ สายพันธุ์ BA 13-0-1 ซึ่งสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ปริมาณสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) รวมทั้งสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วย โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดไบโอพอลิเมอร์และไลโอไฟไลซ์เพื่อเก็บในรูปแบบแห้งโดยไบโอพอลิเมอร์ที่ได้จากการไลโอไฟไลซ์มีสีขาว ลักษณะเป็นผงละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.20 และ

พบว่าจากภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้เท่ากับ 25.013 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.20 ไบโอพอลิเมอร์ในรูปผงแห้ง ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์ BA 13-0-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตร

ในการทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์ โดยนำไบโอพอลิเมอร์ที่ได้จากสภาวะข้างต้นละลายในน้ำ กลั่นความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร นำสารปนเปื้อนที่ไม่ละลายน้ำออกด้วยการปั่นแยก กำจัดเกลือและ สารโมเลกุลขนาดเล็กต่างๆออกจากสารละลายไบโอพอลิเมอร์โดยการไดแอลลิซิส นำสารละลายไบโอพอลิเมอร์ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนมาทำไลโอไฟไลซ์ ทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีนทั้งก่อนและหลังการทำบริสุทธิ์ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.20 จากผลการทดสอบพบว่า ไม่พบทั้งน้ำตาลและโปรตีนในไบโอพอลิเมอร์ จึงสันนิษฐานได้ว่าไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ไม่มีสารประกอบประเภทโปรตีนและน้ำตาล

ตารางที่ 4.20 แสดงปริมาณน้ำตาลและโปรตีนทั้งก่อนและหลังการทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์

ชนิดไบโอพอลิเมอร์	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อ 1 กรัมไบโอพอลิเมอร์)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อ 1 กรัมไบโอพอลิเมอร์)
ก่อนการทำบริสุทธิ์	0.158	0.005
หลังการทำบริสุทธิ์	0.038	0

4.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบในไบโอพอลิเมอร์

4.8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย Analytical Thin Layer Chromatography

โดยนำไบโอพอลิเมอร์บริสุทธิ์ทำปฏิกิริยาการย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์แมล ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง นำสารละลายที่ได้มาตรวจสอบองค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์บนแผ่น TLC โดยมีสารละลายบิวทานอลต่อกรดอะซิติกต่อน้ำ ในอัตราส่วน 3: 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 63: 37 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำมาตรวจผล โดยการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายอะซิโตน โดยมีกรดแอลกลูตามิก โมโนโซเดียมกลูตาเมต แอลโลซีน แอลอะราจีนิน เป็นสารมาตรฐาน พบว่าไบโอพอลิเมอร์ที่ผ่านการย่อยมีองค์ประกอบของสารเพียงชนิดเดียวคือ กรดแอลกลูตามิก หรือกลูตาเมต เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.5 ทั้งกรดแอลกลูตามิก โมโนโซเดียมกลูตาเมต และไบโอพอลิเมอร์ที่ผ่านการย่อย ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ของแอลอะราจีนินและแอลโลซีนเท่ากับ 0.28 และ 0.25 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย Analytical Thin Layer Chromatography เมื่อ 1) แอลอะราจีนิน 2) แอลโลซีน 3) กรดแอลกลูตามิก 4) โมโนโซเดียมกลูตาเมต และ 5) ไบโอพอลิเมอร์ที่ผ่านการย่อย

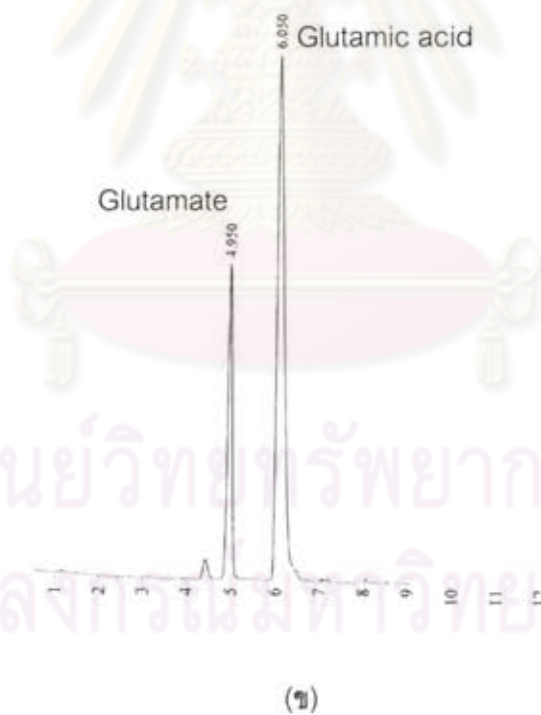
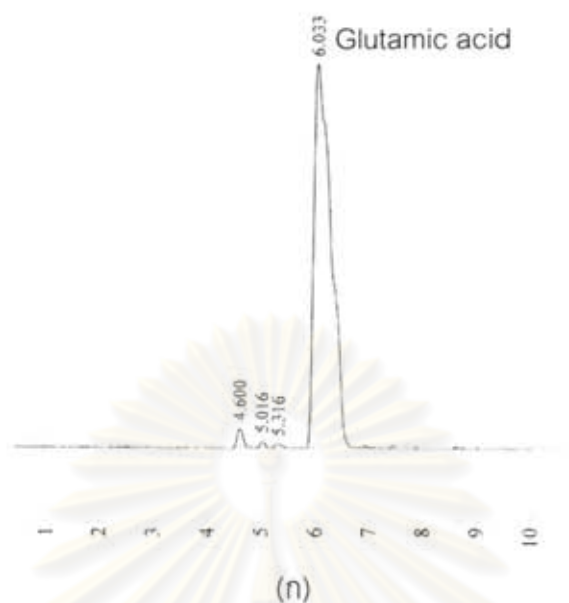
4.8.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

โดยนำไบโอพอลิเมอร์บริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากาย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง กรองผ่านเซลลูโลส อะซีเตต เมมเบรน ที่มีขนาดรูกรอง 0.02 มิลลิเมตร วิเคราะห์ด้วย HPLC ด้วยภาวะตามข้อ 3.8.3 พบว่าองค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 เป็นกลูตาเมตเพียงชนิดเดียวดังแสดงในโครมาโทแกรมในรูปที่ 4.22 ซึ่งมีค่า Retention time ที่ 4.933 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับค่า Retention time ของสารมาตรฐานโมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ 4.950 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของกรดแอสกลูตามิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมต (รูปที่ 4.23)



รูปที่ 4.22 โครมาโทแกรมของ HPLC จากไบโอพอลิเมอร์บริสุทธิ์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



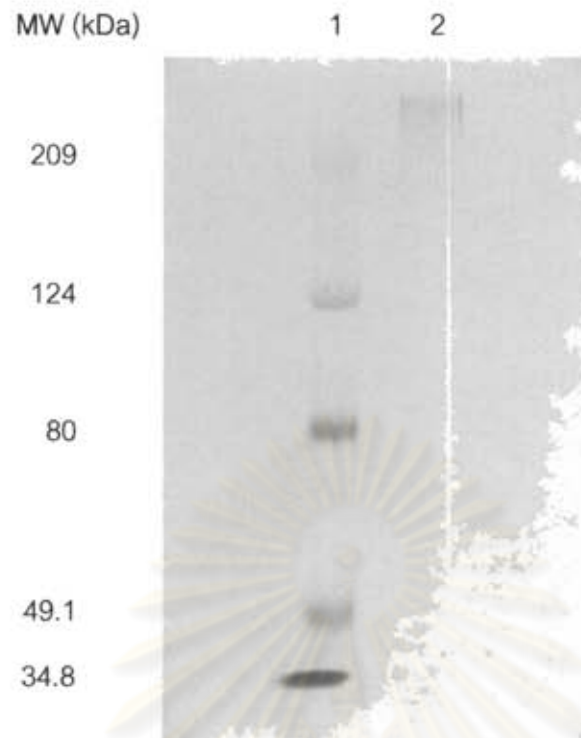
รูปที่ 4.23 โครมาโทแกรมของ HPLC จากกรดแอลกลูตามิก (ก) และโมโนโซเดียมกลูตาเมต (ข) ที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ

4.9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Yamaguchi และคณะ (1996)

นำไบโอพอลิเมอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ละลายด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาหน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่นและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.24 พบว่าไบโอพอลิเมอร์ตัวอย่างให้แถบตัวอย่างเพียงแถบเดียว โดยพบว่าแถบไบโอพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีระยะการเคลื่อนที่เกินกว่าระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์จึงมากกว่า 209,000 ดาลตัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.24 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS-PAGE) โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน

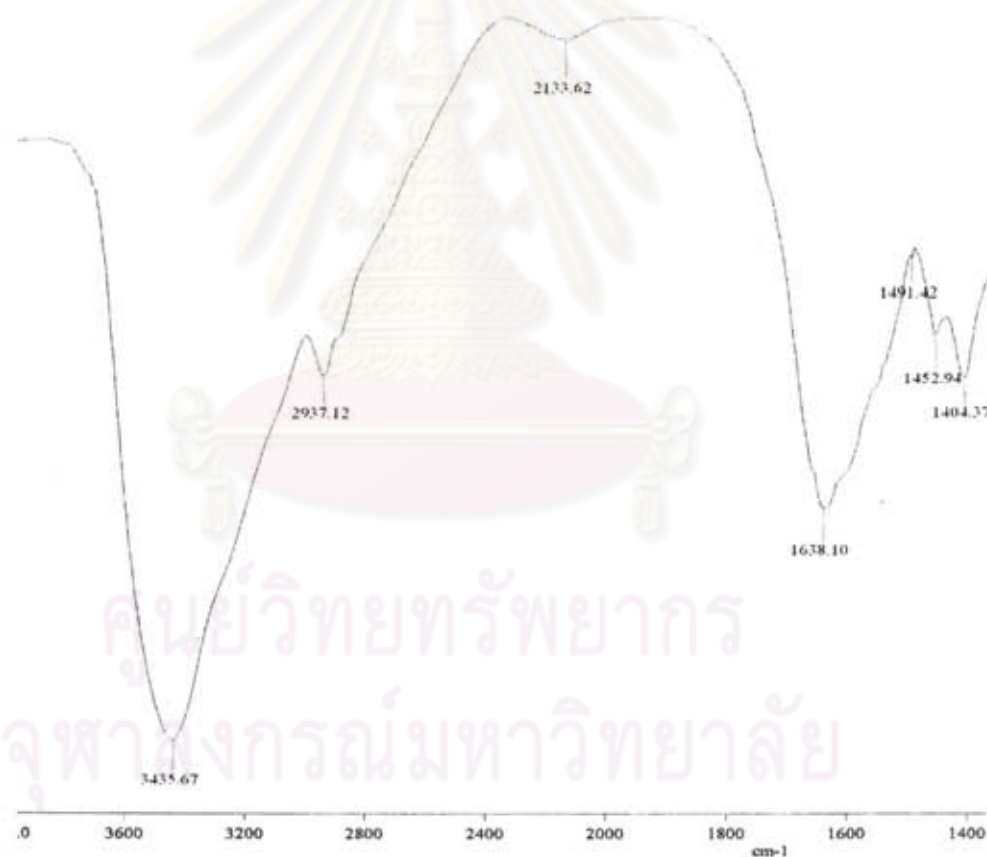
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 ไบโอพอลิเมอร์

โปรตีนมาตรฐานได้แก่

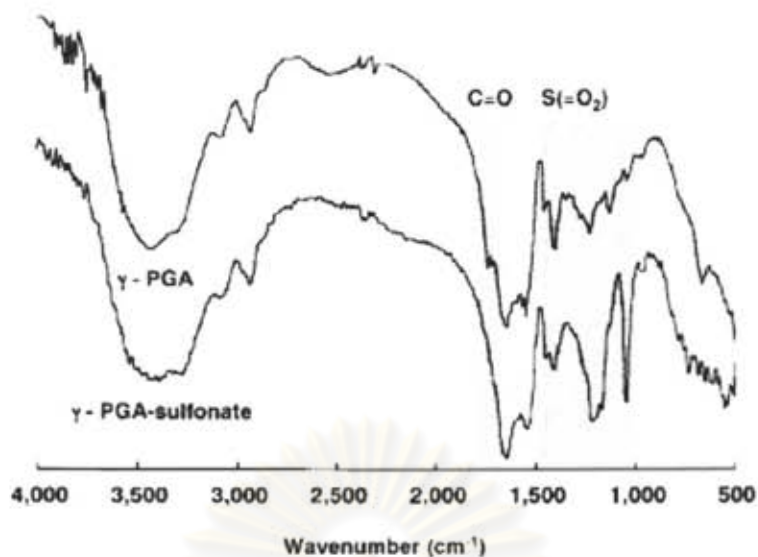
1. ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล 209	กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล 124	กิโลดาลตัน
3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)	น้ำหนักโมเลกุล 80	กิโลดาลตัน
4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล 49.1	กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล 34.8	กิโลดาลตัน

4.10 การวิเคราะห์โครงสร้างไบโอพอลิเมอร์โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

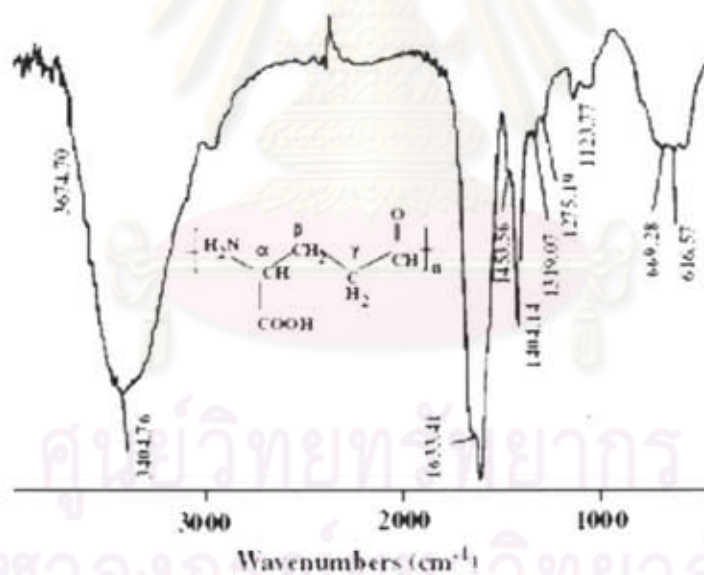
นำไบโอพอลิเมอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วย FT-IR ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังแสดงในรูปที่ 4.25 พบว่า ที่ลำดับส่วน 1638.10 ต่อเซนติเมตร เป็นตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลิก และลำดับส่วน 3435.67 ต่อเซนติเมตร เป็นตำแหน่งของหมู่เอะมิโน และเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของ FT-IR ของพอลิกรดแกมมากลูตามิกซัลไฟเนต (γ -PGA-sulfonate) โดย Matsusaki และคณะ (2002) ในรูป 4.26 และโครมาโทแกรมของ FT-IR ของพอลิกรดแกมมากลูตามิกบริสุทธิ์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. โดย Ye และคณะ (2006) ในรูป 4.27 ก็พบว่าพอลิกรดแกมมากลูตามิกมีค่าลำดับส่วนในช่วง 1638.10-3435.67 ต่อเซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับโครมาโทแกรมเปรียบเทียบ



รูปที่ 4.25 โครมาโทแกรมของ FT-IR ของไบโอพอลิเมอร์



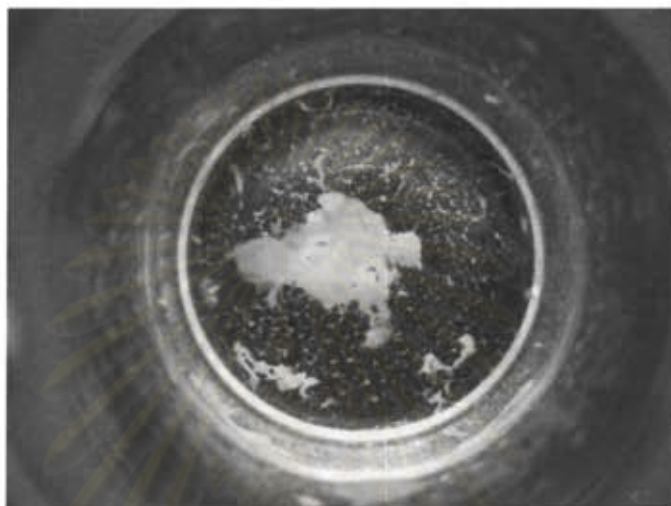
รูปที่ 4.26 โคโรมาโทแกรมของ FT-IR ของพอลิกรดแกมมากลูตามิกซัลโฟเนต (γ -PGA-sulfonate) (Matsusaki และคณะ, 2002)



รูปที่ 4.27 โคโรมาโทแกรมของ FT-IR ของพอลิกรดแกมมากลูตามิกบริสุทธิ์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. (Ye และคณะ, 2006)

4.11 การวิเคราะห์ชนิดประจุของไบโอพอลิเมอร์ (Ueda และคณะ, 1981)

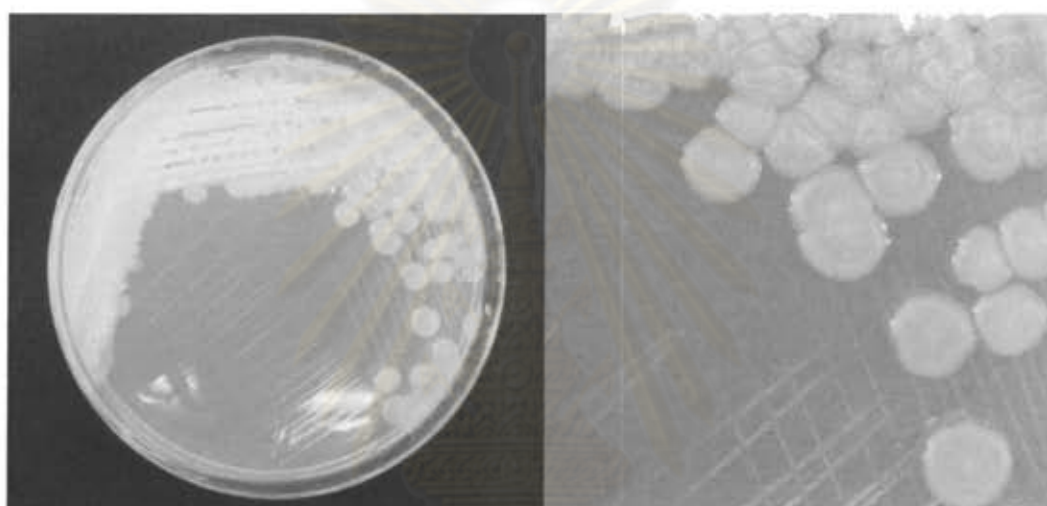
นำไบโอพอลิเมอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัลเติมสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร ตามภาวะในข้อ 3.11 พบว่าเกิดตะกอนในสารละลายแสดงว่าไบโอพอลิเมอร์มีสมบัติเป็น ประจุลบ (acidic biopolymer) (รูปที่ 4.28)



รูปที่ 4.28 ตะกอนที่เกิดขึ้นจากสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) และไบโอพอลิเมอร์

4.12 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ทางอนุกรมวิธาน

จากการจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 บนอาหารแข็ง LB มีลักษณะโคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม โคโลนีนูน ขอบหยักเป็นจีบ และทึบแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.29 เมื่อใช้เข็มเขี่ยโคโลนีจะพบเมือกใส่ภายในโคโลนี เมื่อศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างของเซลล์เป็นแท่งยาวต่อกันเป็นสายยาวดังรูปที่ 4.30 มีขนาดเซลล์กว้าง 0.7-0.9 ไมครอน และ ยาว 1.8-2.0 ไมครอน มีแฟลกเจลลาแบบ peritrichous มีการสร้างสปอร์ทรงรีบริเวณกลางเซลล์ ดังรูปที่ 4.31 ขนาดของสปอร์กว้าง 0.6-0.8 ไมครอน และยาว 1.0-1.4 ไมครอน



รูปที่ 4.29 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 บนอาหารแข็ง LB

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.32 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.33 ลักษณะสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 4.21 ผลการศึกษาเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ทางสัณฐานวิทยาและ สรีรวิทยา

การศึกษา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา
ลักษณะโคโลนี	กลม สีครีม โคโลนีนูน ขอบหยักเป็นจีบ และทึบแสง
การย้อมติดสีแกรม	แกรมบวก
รูปร่างและขนาดของเซลล์	แท่งยาวต่อกันเป็นสายยาว กว้าง 0.7-0.9 ไมครอน ยาว 1.8-2.0 ไมครอน
การสร้างสปอร์	สร้างสปอร์ทรงรีบริเวณกลางเซลล์ กว้าง 0.6-0.8 ไมครอน ยาว 1.0-1.4 ไมครอน
การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ	
20 องศาเซลเซียส	+
25 องศาเซลเซียส	+++
30 องศาเซลเซียส	+++
37 องศาเซลเซียส	++++
40 องศาเซลเซียส	++++
45 องศาเซลเซียส	++
50 องศาเซลเซียส	-

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.22 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1

การทดสอบ	แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1	<i>Bacillus subtilis</i> MSCU 0167*	<i>Bacillus</i> <i>Amyloliquefaciens</i> **
Motility	+	-	+
Anaerobic growth	-	-	-
Catalase test	+	+	+
Oxidase test	+	-	+
Casein hydrolysis	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+
Egg Yolk hydrolysis	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+
Tween 20 hydrolysis	+	+	+
Indole production	-	-	-
Methyl red	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+
Citrate (Simmons)	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+
Propionate reduction	-	-	-

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลบวก)

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลลบ)

* Microbial culture collection ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** อ้างอิงจาก Priest และคณะ, 1987

ตารางที่ 4.23 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 (ต่อ)

การทดสอบ	แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1	<i>Bacillus subtilis</i> MSCU 0167*	<i>Bacillus</i> <i>Amyloliquefaciens</i> **
Growth in NaCl			
2%	+	+	+
5%	+	+	+
7%	+	+	+
10%	-	-	-
Growth in pH			
6.8	+	+	+
5.4	-	+	-

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลบวก)

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลลบ)

* Microbial culture collection ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย

** อ้างอิงจาก Priest และคณะ, 1987

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.24 ผลการทดสอบการทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตเพื่อจำแนก
แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1

การทดสอบ ความสามารถในการ หมักคาร์โบไฮเดรต	แบคทีเรีย สายพันธุ์ BA 13-0-1	<i>Bacillus subtilis</i> MSCU 0167*	<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> **
D-Glucose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Lactose	+	-	+
Maltose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Raffinose	+	+	+
Salicin	+	+	+
L-Arabinose	-	+	-
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-
Ribose	-	+	-
D-Sorbitol	+	+	+
D-Xylose	-	+	-
Galactose	-	-	-
Inulin	-	+	-

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลบวก)

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลลบ)

* Microbial culture collection ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย

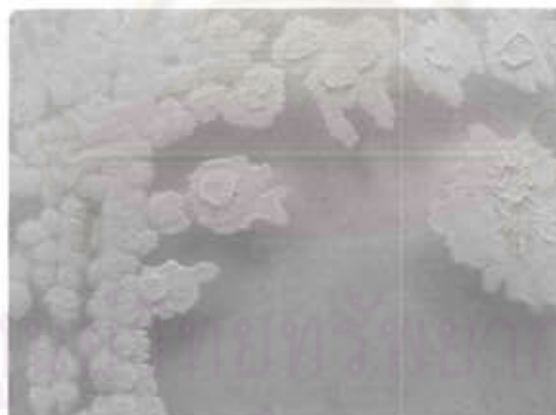
** อ้างอิงจาก Priest และคณะ, 1987

ตารางที่ 4.25 ผลการพิสูจน์ลักษณะบางประการของ *Bacillus amyloliquefaciens* (Valerie และคณะ, 1987) และแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1

ลักษณะ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1
Pigment on Potato	น้ำตาล	น้ำตาล (รูปที่ 4.32)
Growth at 50 °C	-	-
Growth at 10% NaCl	+	weak
Acid from lactose	+	+
Amylase production	+++	+++
Growth as chains	ยาว	ยาว
Diameter of rod	2 nm	2 nm

หมายเหตุ (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลบวก)

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (ผลลบ)



รูปที่ 4.32 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 บน PDA (ภาคผนวก ก)

เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาดังแสดงในตารางที่ 4.21 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆ ความสามารถในการหมักน้ำตาล การย่อยสลายสารต่างๆ และความสามารถในการเจริญเติบโตที่ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียมคลอไรด์ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เปรียบเทียบกับ *Bacillus subtilis* MSCU0167 จาก

Microbial culture collection ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *Bacillus amyloliquefaciens* อ้างอิงตามรายงานของ Priest และคณะ (1987) ดังแสดงในตารางที่ 4.22 4.23 และ 4.24 และลักษณะบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 เปรียบเทียบกับ *Bacillus amyloliquefaciens* (Valerie และคณะ, 1987) ดังแสดงในตารางที่ 4.25 สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ได้เป็น *Bacillus amyloliquefaciens*

การจำแนกแบคทีเรีย BA13-0-1 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1522r จะให้ผลิตภัณฑ์จาก 16S rDNA ขนาดประมาณ 1,457 เบส เมื่อเทียบกับซินติเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยไพรเมอร์ 27f และ 1522r ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (ภาคผนวก จ) นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastN เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ ใน GeneBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.26 ดังนี้

ตารางที่ 4.26 สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	Accession number	เอกสารอ้างอิง
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98	AB255669	Nishiwaki และคณะ (2006)
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AH-E-1	98	AY485275	-

เมื่อพิจารณาผลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ได้เป็น *Bacillus amyloliquefaciens* และจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงแบคทีเรียในสกุล *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งมีความคล้ายคลึง 98 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไบโอพอลิเมอร์น่าจะเป็น *Bacillus amyloliquefaciens* BA 13-0-1

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไบโอพอลิเมอร์จากตัวอย่างอาหารหมักและถั่วหมักจากแหล่งต่างๆ จำนวน 102 ตัวอย่าง โดยนำสารละลายตัวอย่างมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB สังเกตลักษณะการสร้างเมือกเยิ้มบนผิวโคโลนี (Yoon และคณะ, 2000) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเมือกได้ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ นำมาคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับขวดเขย่า พบว่าในจำนวนนี้มีแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ในปริมาณสูง จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับขวดเขย่าซ้ำอีกครั้ง โดยเปรียบเทียบกับ *Bacillus subtilis* NT2 ที่แยกได้จากถั่วหมักนัตโตะประเทศญี่ปุ่น พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ซึ่งคัดแยกได้จากเต้าหู้ยี้ ตลาดบางซื่อ กรุงเทพมหานคร สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ในปริมาณสูงใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ NT2 คือ 4.927 กรัมต่อลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร อ้างอิงจาก Xu และคณะ (2005) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ โดยชั่วโมงที่ 42 ของการเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ถึงแม้ว่าในชั่วโมงที่ 15 แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในปริมาณสูงสุดแต่กลับพบว่าการปั่นแยกเซลล์ในชั่วโมงที่ 15 ทำได้ยากส่งผลให้ต้องเพิ่มการเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อรวมทั้งเพิ่มปริมาณเอทานอลในการตกตะกอนอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Troy (1973) กล่าวว่าในช่วงแรกของการเจริญของแบคทีเรีย γ -PGA ที่สร้างขึ้นจะเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์คล้ายกับแคปซูลจึงก่อให้เกิดปัญหาในการแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และรูปแบบการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 คล้ายกับรูปแบบการเจริญของ *B. subtilis* NX-2 ที่คัดแยกจากดิน พบว่าหลังจากการเลี้ยง 4 ชั่วโมง แบคทีเรียเริ่มมีการเจริญและการผลิต γ -PGA ซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่ *B. subtilis* NX-2 ผลิตควบคู่กับการเจริญ (Xu และคณะ, 2005)

ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ที่คัดแยกได้ เพื่อศึกษาการผลิตไบโอพอลิเมอร์ พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้การผลิตไบโอพอลิเมอร์สูง และมีราคาถูกสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีการเจริญเติบโตได้ดี

เมื่อใช้มอลโดสเป็นแหล่งคาร์บอน และยังสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง พบว่าเมื่อไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียก็ยังสามารถเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ในปริมาณต่ำ สันนิษฐานได้ว่าแบคทีเรียมีการใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารในการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยเมื่อแปรผันความเข้มข้นของซูโครส พบว่าซูโครสที่ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์ และจากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 พบว่าของสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากสารสกัดจากยีสต์นอกจากมีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังเป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตไบโอพอลิเมอร์อีกด้วย นอกจากนี้ในการกระตุ้นให้แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์นั้น จะต้องมีการเติมสารกระตุ้นในกลุ่มของกรดกลูตามิก (Kubota และคณะ, 1993b; Kunioka และคณะ, 1994) แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตแทนเนื่องจากมีราคาถูก ซึ่งพบว่าในการแปรผันความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมตเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ปริมาณการผลิตของไบโอพอลิเมอร์สูงสุด เมื่อมีแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) รวมด้วย

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 7.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้สูงขึ้น และเมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถเจริญและมีการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในช่วงค่าความเป็นกรดเบสกว้างเท่ากับ 5.5-8 โดยเฉพาะช่วงค่าความเป็นกรดเบส 7.5-8 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตไบโอพอลิเมอร์สูง จากการศึกษาโดย Troy (1973) พบว่าการเพิ่มค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้ไบโอพอลิเมอร์ยึดเกาะกับเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น จึงเป็นปัญหาต่อการแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงเลือกศึกษาค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 จากการรายงานเกี่ยวกับค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น พบว่าจะขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อเป็นหลัก เช่น จากการรายงานของ Cromwick และ Gross (1995) พบว่า *B. licheniformis* ATCC 9945A สามารถผลิต PGA ในปริมาณสูงเมื่อปรับค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 แต่ในขณะที่การผลิต PGA โดย *B. licheniformis* A35 ต้องการค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเท่ากับ 7.2 (Cheng และคณะ,

1989) และ *B. subtilis* F-2-01 ต้องการค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 (Kubota และคณะ, 1993a, b) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จึงเป็นผลดีต่อการนำไปแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 8 เปอร์เซ็นต์ และทำการเลี้ยงแบคทีเรียตามภาวะข้างต้นบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง จะให้ปริมาณการผลิตของไบโอพอลิเมอร์สูงสุด และในการศึกษาช่วงเวลาในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมโดยแปรผันเวลาที่เหมาะสมในการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต พบว่าเมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นสองเท่าเวลาที่ 10 ชั่วโมง จะเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้สูงขึ้นถึง 4 เท่าคือ เท่ากับ 25.013 กรัมต่อลิตร สันนิษฐานว่าช่วงเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไบโอพอลิเมอร์ ซึ่งสนับสนุนข้อสันนิษฐานดังกล่าวจากรายงานของ Kubota และคณะ (1993b) และ Kunioka และคณะ (1994) ที่กล่าวว่า การเติมกรดแอลกลูตามิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรดแอลกลูตามิกจะมีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ γ -PGA และเมื่อเปรียบเทียบผลการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตในช่วงเวลาต่างกับกับรายงานของ Kambourova และคณะ (2001) เกี่ยวกับผลของการเติมกลูตาเมตต่อการผลิต PGA ของ *B. licheniformis* S173 ซึ่งจากรายงานพบว่าเมื่อเติมโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรในช่วงต้นของการเจริญแบบทวีคูณจะส่งผลให้มีการสังเคราะห์ PGA แต่เมื่อเติมโซเดียมกลูตาเมตในช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ PGA และจากการทดลองพบว่าเมื่อเติมโซเดียมกลูตาเมตในช่วงต้นของการเจริญแบบทวีคูณของ *B. licheniformis* S173 สามารถผลิต PGA ได้เพียง 1 กรัมต่อลิตร

ในการทำบริสุทธิ์ไบโอพอลิเมอร์ โดยนำสารละลายไบโอพอลิเมอร์ที่ได้กำจัดเกลือและสารโมเลกุลขนาดเล็กต่างๆ ออกจากสารละลายไบโอพอลิเมอร์โดยการไดอะลิซิส นำสารละลายไบโอพอลิเมอร์ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนมาทำไลโอไฟไลซ์ และทดสอบปริมาณน้ำตาลและโปรตีนทั้งก่อนและหลังการทำบริสุทธิ์ พบว่าไบโอพอลิเมอร์ดังกล่าวมีปริมาณน้ำตาลน้อยและไม่มีโปรตีน จึงสรุปว่าไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ไม่ใช่ไบโอพอลิเมอร์ที่เป็นสารประกอบประเภทน้ำตาล (พอลิแซ็กคาไรด์) และโปรตีน จึงวิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอพอลิเมอร์ด้วย analytical TLC ในการเตรียมไบโอพอลิเมอร์ก่อนการวิเคราะห์ด้วย TLC โดยการย่อยไบโอพอลิเมอร์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง จากการวิเคราะห์พบว่า ไบโอพอลิเมอร์ที่ผ่านการย่อยด้วยภาวะรุนแรงจนได้เป็นโมเลกุลเดี่ยวมี

องค์ประกอบเพียง 1 ลำดับส่วน ที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.5 ซึ่งตรงกับค่า R_f ของกรดแอลกลูตามิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่เป็นตัวควบคุม จึงสันนิษฐานได้ว่าไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีโมเลกุลเดี่ยวของกรดแอลกลูตามิกหรือกลูตาเมตเป็นองค์ประกอบต่อกันเป็นสายยาวของไบโอพอลิเมอร์ จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC จากโครมาโตแกรม รูปที่ 4.21 พบว่าลำดับส่วนของไบโอพอลิเมอร์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรด มี Retention time ที่ 4.933 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับค่า Retention time ของสารมาตรฐานโมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ 4.950 นาที (รูปที่ 4.20) พบว่าสารดังกล่าวเป็นโครงสร้างของกลูตาเมต ซึ่งอยู่ในรูปของเกลือของกรดกลูตามิก

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์โดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น และเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.22 พบว่าไบโอพอลิเมอร์ตัวอย่างให้แถบตัวอย่างเพียงแถบเดียว พบว่าแถบไบโอพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีระยะเวลาการเคลื่อนที่เกินกว่าระยะเวลาการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ผู้วิจัยจึงไม่สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของไบโอพอลิเมอร์ได้ สามารถสรุปได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีค่ามากกว่า 209,000 ดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับในหลายรายงานเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของกรดแกมมาพอลิกลูตามิก เช่น รายงานของ Ito และคณะ (1996) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ PGA ซึ่งผลิตโดย *B. subtilis* TAM-4 มีค่าประมาณ 600,000-1,600,000 ดาลตัน Cheng และคณะ (1989) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ PGA ซึ่งผลิตโดย *B. licheniformis* A35 มีค่าประมาณ 300,000-500,000 ดาลตัน และ Kubota และคณะ (1993a, b) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ PGA ซึ่งผลิตโดย *B. subtilis* F02-1 มีค่าประมาณ 1,200,000 ดาลตัน

การวิเคราะห์โครงสร้างไบโอพอลิเมอร์โดยวิธี FT-IR พบว่า ที่ลำดับส่วน 1638.10 ต่อเซนติเมตร เป็นตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลิก และลำดับส่วน 3435.67 ต่อเซนติเมตร เป็นตำแหน่งของหมู่เอมิโน และเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ FT-IR เปรียบเทียบ ดังรูปที่ 4.27-4.28 พบว่าพอลิกรดแกมมาพอลิกลูตามิกมีค่าลำดับส่วนในช่วง 1638.10-3435.67 ต่อเซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับโครมาโทแกรมเปรียบเทียบกับ Matsusaki และคณะ (2002) และ Ye และคณะ (2006)

การวิเคราะห์ชนิดประจุของไบโอพอลิเมอร์ (Ueda และคณะ, 1981) โดยการตกตะกอนของสารละลายไบโอพอลิเมอร์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ด้วยสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) พบว่าเกิดตะกอนในสารละลายแสดงว่าไบโอพอลิเมอร์มีสมบัติเป็นประจุลบ (anionic biopolymer)

การจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีลักษณะโคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม โคโลนีนูน ขอบหยักเป็นจีบ และทึบแสง เมื่อใช้เข็มเย็บโคโลนีจะพบเมือกใสภายในโคโลนี การย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างของเซลล์เป็นแท่งยาวต่อกันเป็นสายยาว มีขนาดเซลล์กว้าง 0.7-0.9 ไมครอน และ ยาว 1.8-2.0 ไมครอน มีแฟลกเจลลาแบบ peritrichous มีการสร้างสปอร์ทรงรี บริเวณกลางเซลล์ ขนาดของสปอร์กว้าง 0.6-0.8 ไมครอน และยาว 1.0-1.4 ไมครอน และจากการศึกษาทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology รายงานของ Priest และคณะ (1987) และ Valerie และคณะ (1987) โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆ ความสามารถในการหมักน้ำตาล การย่อยสลายสารต่างๆ และความสามารถในการเจริญเติบโตที่ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 ได้เป็น *Bacillus amyloliquefaciens*

การจำแนกแบคทีเรีย BA13-0-1 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ขนาด 1,457 เบส พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA แบคทีเรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *B. amyloliquefaciens* ซึ่งมีความคล้ายคลึง 98 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไบโอพอลิเมอร์น่าจะเป็น *B. amyloliquefaciens* BA 13-0-1

เนื่องจากรายงานเกี่ยวกับการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกโดย *B. amyloliquefaciens* ยังมีน้อย โดยส่วนใหญ่จะเป็นรายงานเกี่ยวกับการคัดแยกและพิสูจน์เชื้อจากอาหารหมักแหล่งต่างๆ ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จึงเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกทั้งอาหารและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* ซึ่งพบว่า *B. amyloliquefaciens* BA 13-0-1 ที่คัดแยกได้สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้ถึง 25.013 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษา ในขณะที่ผลการศึกษาของ Meerak และคณะ (2007) และ Meerak และคณะ (2008) โดยการคัดแยกเชื้อจากถั่วหมักจากแหล่งต่างๆ พบว่า *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกได้สามารถผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกได้เพียง 5-6 กรัมต่อลิตรเท่านั้น เมื่อใช้สูตรอาหารอ้างอิงจาก Kunioka และ Goto (1994)

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมพบว่า *B. amyloliquefaciens* BA 13-0-1 สามารถเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ในภาวะที่หลากหลาย โดยสามารถเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้เมื่อใช้ค่าความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 5.5-8 และที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และจากปริมาณการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของ *B. amyloliquefaciens* BA 13-0-1 เท่ากับ 25.013 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตร (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีซูโครส 35 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว

สารสกัดจากยีสต์ 7 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีภาวะที่เหมาะสมซึ่งใช้เวลาในการเลี้ยงเพียง 42 ชั่วโมง เนื่องจากการรายงานส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการผลิต 2-4 วัน (Troy, 1973; Cromwick และ Gross, 1996, Kunioka และ Goto, 1994; Ito และคณะ, 1996; Cheng และคณะ, 1989) และจะให้ผลผลิตต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แบคทีเรียและอาหารที่ใช้ในการผลิต โดยส่วนใหญ่ในการผลิต PGA จะใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูงเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิต เช่น *B. subtilis* TAM-4 สามารถผลิต PGA ได้ 20 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ฟรักโทสความเข้มข้นสูงถึง 75 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (Ito และคณะ, 1996) หรือใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารถึง 2 แหล่ง เช่น *B. licheniformis* ATCC 9945A สามารถผลิต PGA ได้ 17-23 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอล 80 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 12 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (Troy, 1973) *B. subtilis* F-02-1 สามารถผลิต PGA ได้ 50 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กรดกลูตามิก 70 กรัมต่อลิตร กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน (Kubota และคณะ, 1993a, b) *B. subtilis* (natto) สามารถผลิต PGA ได้ 35 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้หมอลโธส 60 กรัมต่อลิตร และซอสถั่วเหลือง 70 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน (Ogawa และคณะ, 1997)

นอกจากนี้จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการย่อยแป้งของ *B. amyloliquefaciens* BA13-0-1 พบว่าเกิดบริเวณไฮดรอลิกว่างดังแสดงผลในตารางที่ 4.25 จากรายงานของ Welker และ Campbell (1967) พบว่า *B. amyloliquefaciens* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีแอกติวิตีสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. subtilis* นอกจากนี้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสยังเป็นข้อบ่งชี้ความแตกต่างระหว่าง *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* อีกด้วย ซึ่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคสิดิกในแป้งให้กลายเป็นโมเลกุลเดี่ยวของกลูโคส ดังนั้นในการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกในระดับอุตสาหกรรม อาจใช้สารอาหารในกลุ่มแป้งซึ่งมีราคาถูกเป็นสารตั้งในการผลิตเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต รวมทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* ได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งอุตสาหกรรมอาหาร (Kandra, 2003) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปโอฟอลิเมอไรส์ที่ผลิตได้จาก *B. amyloliquefaciens* BA 13-0-1 ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระหว่างการผลิต เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะสำหรับการเลี้ยงเชื้อให้มีความเหมาะสมกับการผลิตไบโอพอลิเมอร์มากยิ่งขึ้น
2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของไบโอพอลิเมอร์ รวมทั้งความคงทนของไบโอพอลิเมอร์ในภาวะต่างๆ ก็มีความสำคัญต่อการนำไบโอพอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ต่อไป
3. ควรมีการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารโดยการนำวัสดุทางการเกษตรที่เหลือใช้ ซึ่งมีราคาถูกและมีปริมาณมากในประเทศไทยมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตระดับอุตสาหกรรม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

รัศมีกร สิงห์เจริญ. 2544. การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนจากถั่วเน่าที่สามารถผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภาษาอังกฤษ

Ashiuchi, M., Mawa, C., Kamei, T., Song, J. J., Hong, S. P., and Sung, M. H. 2001. Physiological and biochemical characteristics of poly γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 268:5321-5328.

Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., and Misono, H. 1998. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO3336 producing poly- γ -glutamate. J. Biochem. 123:1156-1163.

Bhattacharyya, D., Hestekin, J. A., Brushaber, Cullen, P., L., Bachas, L. G., and Sikdar, S. K. 1998. Novel poly-glutamic acid functionalized microfiltration membranes for sorption of heavy metals at high capacity. J. Membrane Sci. 141:121-135.

Birrer, G. A., Cromwick, A. M., and Gross, R. A. 1994. γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis*: physiological and biochemical studies. Int. J. Biol. Macromol. 16:265-275.

Bovarnick, M. 1942. The formation of extracellular D (-) glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 145:415-424.

Candela, T., and Fouet, A. 2005. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. Mol. Microbiol. 57:717-726.

Candela, T., Mock, M., and Fouet, A. 2005. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* poly-glutamate capsule synthesis. J. Bacteriol. 187:7765-7772.

Cheng, C., Asda, Y., and Asida, T. 1989. Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. Agric. Biol. Chem. 53:2369-2375.

- Chibnal, A. C., Rees, M. W., and Richards, F. M. 1958. Structure of the polyglutamic acid from *Bacillus subtilis*. J. Biochem. 68(1):129-135.
- Choi, H. J., Yang, R., and Kunioka, M. 1995. Synthesis and characterization of pH-sensitive and biodegradable hydrogels prepared by γ -irradiation using microbial poly (γ -glutamic acid) and poly (ϵ -lysine). J. Appl. Polym. Sci. 58:807-814.
- Cromwick, A. M., and Gross, R. A. 1995. Effect of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC9945A physiology and γ -poly (glutamic acid) formation. Int. J. Bio. Macromol. 16:265-275.
- Cromwick, A. M., and Gross, R. A. 1996. Effects of pH and aeration on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. Biotechnol. Bioeng. 50:222-227.
- Dearfield, K. L., and Abermathy, C. O. 1988. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. Mutant. Res. 195:45-77.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. Anal. Chem. 28:350-356.
- Edde, B., Tossier, H., Le Caer, H. P., Desbruyeres, E., Gros, F., and Denoulet, P. 1990. Posttranslational glutamylation of α -tubulin. Science. 247:83-85.
- Findlay, R. H., and White, D. C. 1983. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. Appl. Environ. Microbiol. 45:71-78.
- Fuji, H. 1963. On the formation of mucilage by *Bacillus natto*. Part III chemical constitutions of mucilage in natto (1). Nippon Nogeikagaku Kaishi. 37:407-411.
- Fumio, Y., Yoshihiro, O., Mamoru, K., Katsumi, Y., and Hiroshi, M. 1996. Detection of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by SDS-PAGE. Biosci. Biotech. Biochem. 60(2):255-258.
- Giannos, S. A., Shah, D., Gross, R. A., Kaplan, D. L., and Mayer, J. M. 1990. Novel Biodegradable Microbial Polymers : Poly (glutamic acid) produced by bacterial

- fermentation. In: E.A. Dawes (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 457-460.
- Goto, A., and Kunioka, M. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IPO 3335. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:1031-1305.
- Grazer, A. N., and Nikaido, H.1994. Microbial Biotechnology : fundamentals of applied microbiology. In microbial polysaccharides and polyesters. W.H. New York: Freeman and Company, pp. 265-267.
- Green, B. D., Battisti, L., Koehler, T. M., Thorne, C. B., and Ivins, B. E. 1985. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 49:291-297.
- Gutcho, S. 1977. Waste treatment with polyelectrolytes and other flocculants. Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ, pp. 1-37.
- Hara, T., and Ueda, S. 1982. Regulation of polyglutamate production in *Bacillus subtilis* (natto); transformation of high PGA productivity. Agric. Bio. Chem. 46:2275-2281.
- Hara, T., Aumayr, A., Fujio, Y., and Ueda, S. 1982a. Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (natto) with acridine orange. Appl. Environ. Microbiol. 4:1456-1458.
- Hara, T., Aumayr, A., Fujio, Y., and Ueda, S. 1982b. Polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (natto) . J. Appl. Biochem. 4:112-120.
- Hara, T., Chetanachit, C., Fujio, Y., and Ueda, S. 1986. Distribution of plasmids in polyglutamate producing *Bacillus* strains isolated from "natto" like fermented soybeans, "Thau Nao" in Thailand. J. General. Appl. Microbiol. 32:241-249.
- He, L. M., Neu, M. P., and Vanderberg, L. A. 2000. *Bacillus licheniformis* γ -glutamyl exopolymer physiochemical characterization and U(VI) interaction. Environ. Sci. Technol. 34:1694-1701.
- Holzer, H. 1969. Regulation of enzymes by enzyme-catalyzed chemical modification. Adv. Enzymol. 32: 297-326.
- Housewright, R. D. 1962. The biosynthesis of homopolymeric peptides. The Bacteria: A Treatise on Structure and Function. In: Gunsalus, I.C., Stanier, R.Y. (Eds.). 3 vol. New York: Academic Press, pp. 389-412.

- Ito, Y., Tanaka, T., Onmachi, T., and Asada, Y. 1996. Glutamic acid independent production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:1239-1242.
- Jennifer, I. H., and Quarmby, J. 1999. Biopolymers in wastewater treatment. Biotechnol. 10:259-262.
- Kambourova, M., Tagney, and M., Priest, F. 2001. Regulation of poly-glutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol. 67(2):1004-1007.
- Kandra, L. 2003. α -amylases of medical and industrial importance. J. Mol. Struct: Theochem. 487-498.
- Ko, Y. H., and Gross, R. A. 1998. Effects of glucose and glycerol on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC3345A. Biotechnol. Bioeng. 57:430-437.
- Kubota, H., Matrunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satoh, A., Tanaka, T., and Tanguchi, M. 1993a. Convenient and quantitative esterification of poly (γ -glutamic acid) produced by microorganism. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 31:2877-2878.
- Kubota, H., Matrunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satoh, A., Tanaka, T., and Tanguchi, M. 1993b. Production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57:1212-1213.
- Kunioka, M., and Furusawa, K. 1997. Poly (γ -glutamic acid) hydrogel prepare from microbial poly (γ -glutamic acid) and alkanediamine with water soluble carbodiimide. Appl. Polym. Sci. (in press).
- Kunioka, M., and Goto, A. 1994. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. Appl. Microbio. Biotechnol. 40:867-872.
- Kunno, A., Taguchi, T., and Yamaguchi, T. 1988b. Bakery products and noodles containing polyglutamic acid. US Patent 4,888,193.
- Kunno, A., Taguchi, T., and Yamaguchi, T. 1988a. New use of polyglutamic acid for foods. EP 0284386 B1.

- Lee, S. H., Lee, S. O., Jang, K. L., and Lee, T. H. 1995. Microbial flocculant from *Arcuadendron* sp. TS-49. Biotechnol. Lett. 17:95-100.
- Leonard, C. G., Housewright, R. D., and Throne, C. B. 1958. Effect of metal ions on the optical specificity of glutamine synthetase and glutamyl transferase of *Bacillus licheniformis*. Biochem. Biophys. Acta. 62:432-434.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, S. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:267-275.
- Macaskie, L. E., and Basnakova, G. 1998. Microbially-enhanced chemisorption of heavy metals: a method for the bioremediation of solutions containing long-lived isotopes of neptunium and plutonium. Environ. Sci. Technol. 32: 184-187.
- Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., and Yoshikawa, M. 1989. Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 171:722-730.
- Matsusaki, M., Serizawa, T., Kishida, A., Endo, T., and Akashi, M. 2002. Novel functional biodegradable polymer: synthesis and anticoagulant activity of poly (γ -glutamic acid) sulfonate (γ -PGA-sulfonate). Bioconjugate Chem. 13:23-28.
- McGuire, J. J., and Coward, J. K. 1984. Pteroylpolyglutamates: biosynthesis, degradation, and function: Folates and Pterins. Chemistry and Biochemistry of Folate. In: Blakley R.L., Benkovic, S.J. (Eds.). New York: Wiley, pp. 135-190.
- McLean, R. C., Beauchemin, D., and Beveridge, T. J. 1992. Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule. Appl. Environ. Microbiol. 58:405-408.
- Meerak, J., Iida, H., Watanabe, Y., Miyashita, M., Sato, H., Nakagawa, Y., and Tahara, Y. 2007. Phylogeny of γ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented soybean foods manufactured in Asian countries. J. Gen. Appl. Microbiol. 53:315-323.
- Meerak, J., Yukphan, P., Miyashita, M., Sato, H., Nakagawa, Y., and Tahara, Y. 2008. Phylogeny of γ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented locust bean product manufactured in West Africa. J. Gen. Appl. Microbiol. 54:159-166.

- Mitsuiki, M., Mizuno, A., Tanimoto, H., and Motoki, M. 1998. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo-and poly (glutamic acid)s. J. Agric. Food Chem. 46:891-895.
- Murao, S. 1969. On the polyglutamic acid fermentation. Koubunshi. 16:1204-1212.
- Nagai, T., Koguchi, K., and Ito, Y. 1997. Chemical analysis of poly- γ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (natto): evidence that plasmids are not involved in poly- γ -glutamic acid production. J. Gen. Appl. Microbiol. 43:139-143.
- Niemetz, R., Karcher, U., Kandler, O., Tindall, B. J., and Konig, H. 1997. The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*. Eur. J. Biochem. 249:905-911.
- Nishikawa, M., and Ogawa, K. 2002. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method. Appl. Environ Microbiol. 68(7): 3575-3581.
- Nishiwaki, H., Ito, K., Shimomura, M., Nakashima, K., Kawamura, T., and Matsuda, K. 2006. Association of insecticidal microorganism with larvae of Myreleon bore. Hisashi Nishiwaki. Unpublished Manuscript.
- Ogawa, Y., Hosokawa, H., Hamano, M. and Matai, H. 1991. Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto). Agric. Bio. Chem. 55:2971-2977.
- Ogawa, Y., Yamaguchi, F., Yuasa, K., and Tahara, Y. 1997. Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. Biosci. Biotech. Biochem. 61:1684-1687.
- Onodera, T., Ohmachi, T., and Asada, Y. 1994. Plasmid-independent poly (γ -glutamic acid) production in bacteria producing this acid *de novo*. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 68:1475-1478.
- Otani, Y., Tabata, Y., and Ikada, Y. 1996a. A new biological glue from gelatin and poly (L-glutamic acid). J. Biomed. Mater. Res. 31:157-166.
- Otani, Y., Tabata, Y., and Ikada, Y. 1996b. Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). Biomaterials. 17:1387-1391.

- Park, T. G., and Hoffman, A. S. 1992. Synthesis and characterization of pH- and/or temperature sensitive hydrogels. J. Appl. Polym. Sci. 46:659-664.
- Potter, M., Oppermann-Sanio, B. F., and Steinbuchel, A. 2001. Cultivation of bacteria producing polyamino acid with liquid manure as carbon and nitrogen source. Appl. Envi. Microbiol. 67:617-622.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., and Berkeley, C. W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Nov., nom. Rev. Int. J. System. Bacteriol.37(1):69-71.
- Prasertsan, P., Madla, S., and Methakanon, S. Characterization of polyglutamic acid produced from thermotolerant bacteria isolates. International Symposium on the Bioconversion of Renewable Raw Materials, Germany. 2000.
- Ralph, H., Kappler, T., and Posten, C. 2006. Pilot-scale press electrofiltration of biopolymers. Separat. and Purificat. Technol. 51:303-309.
- Sakai, K., Sonoda, C., and Murase, K. 2000. Bitterness relieving agent. JP Patent WO0021390.
- Saimura, M., Ikezaki, A., Takahara, M., and Hirohara, H. 2002. Structures of ϵ -polylysine produced by several actinomycetes and their classification on the basis of productivity of ϵ -poly lysine. Annu. Meet Soc. Biosci. Biotechnol. Biochem. Tokyo. 54-67.
- Sawamura, S. 1913. On *Bacillus natto*. J. Coll. Agric. Tokyo. 5:189-191.
- Schwamborn, M. 1998. Chemical synthesis of polyaspartated: a biodegradable alternative to currently used polycarboxylate homo- and co-polymers. Polym. Degrad. Stab. 59(1): 39-45.
- Shi, F., Xu, Z., and Cen, P. 2007. Microbial production of natural poly amino acid. Sci. China. Ser B-chem. 50(3):219-303.
- Shih, I. L., and Van, Y. T. 2001. The production of poly (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. Bioresour. Technol. 79:207-225.
- Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, Y. T., Lin, L. C., and Chang, H. G. 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. Bioresour. Technol. 78:267-272.
- Shima, S., and Sakai, H. 1977. Polylysine produced by *Streptomyces*. Agric. Biol. Chem. 41(9):1907-1909.

- Shima, S., and Sakai, H. 1981. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies. Agric. Biol. Chem. 45(2):2497-2502.
- Simon, R. D. 1987. The Cyanobacteria. Amsterdam. Elsevier. 199-225.
- Simon, R. D., and Weathers, P. J. 1976. Determination of the structure of the novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria. Biochem. Biophys. Acta. 420(1):165-176.
- Stadtman, E. R. 1966. Allosteric regulation of enzyme activity. Adv. Enzymol. 28:141-154.
- Sundhagul, M., Smanmathroj, P., and Bhodacharoen, W. 1972. Thua-Nao: A fermented soybean food of northern Thailand. Thai J. Agri. Sci. 5:43-56.
- Tahara, Y., Urushibata, Y., Terahara, H., and Tokuyama, S. γ -polyglutamic acid biosynthesis and metabolic pathway in *Bacillus subtilis* NR-1. International Conference Bacilli, Japan. 1998.
- Takeda, M., Koizumi, J., Matsuoka, H., and Hikuma, M. 1992. Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Nocardia amarae*. J. Ferment. Bioeng. 74:408-409.
- Tamang, J. P., and Nikkuni, S. 1998. Effect of temperatures during pure culture fermentation of kinema. World J. Microbiol. Biotechnol. 14:847-850.
- Tanaka, T., Hiruta, O., Futamura, T., Uotani, K., Satoh, A., Taniguchi, M., and Oi, S. 1993. Purification and characterization of poly (γ -glutamic acid) hydrolase from a filamentous fungus, *Myrothecium* sp. TM-4222. Biosci. Biotech. Biochem. 57:2148-2153.
- Tanimoto, H., Sato, H., Karasawa, M., Iwasaki, K., Oshima, A., and Adachi, S. 1995. Feed composition containing poly- γ -glutamic acid. JP Patent WO9635339.
- Thomas, C., and Fouet, A. 2006. Poly-gamma-glutamate in bacteria. Molec. Microbiol. 60(5):1091-1098.
- Thorne, C. B., Gomez, C. G., Blind, G. R., and Housewright, R. S. 1953. Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis*. III. Factors affecting peptide production in synthesis liquid media. Bacteriol. 65:472-478.
- Thorne, C. B., Gomez, C. G., and Housewright, R. D. 1955. Transamination of D-amino acids by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 69:357-362.

- Thorne, C. B., Gomez, C. G., Noyes, H. E. and Housewright, R. D. 1954. Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 68:307-315.
- Toriumi, D. 1996. Surgical tissue adhesives: host tissue response, adhesive strength and clinical performance. Surgical Adhesives and Sealants, Current Technology and Application. In: Sierra, D., Saits, R. (Eds.). USA: Technomic, pp. 61-69.
- Troy, F. A. 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly (γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. 1. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. J. Biol. Chem. 248:305-316.
- Uchida, I., Sekizaki, T., Hashimoto, K., and Terakado, N. 1985. Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60-megadation plasmid. J. Gen. Microbiol. 131:363-367.
- Ueda, S., Momii, F., Osajima, K., and Ito, K. 1981. Extracellular polysaccharide produced by strain no. 626 of *Aeromonas hydrophila*. Agric. Biol. Chem. 45(9):1977-1981.
- Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y. 2002. Characterization of the *Bacillus subtilis* *ywsC* gene, involved in γ -polyglutamic acid production. J. Bacteriol. 184:337-343.
- Valcani, B. E., and Margallith, P. 1957. A new (*Flavobacterium polyglutamicum*) which hydrolyzed the γ -L-Glutamyl bond in polypeptides. J. Bacteriol. 74:646-655.
- Valerie, A. C., Botes, D. P., and Thomson, J. A. 1987. A molecular approach to the characterization of an industrial *Bacillus amyloliquefaciens* strain. Curr. Microbiol. 16:93-96.
- Vietri, N. J., Marrero, R., Hoover, T. A., and Welkos, S. L. 1995. Identification and characterization of a trans-activator involved in the regulation of encapsulation by *Bacillus anthracis*. Gene. 152:1-9.
- Weber, J. 1990. Poly (γ -glutamic acid)s are the major constituents of Nematocysts in Hydra (*Hydrasoa Cnidaria*). J. Biol. Chem. 265:9664-9669.
- Welker, N. E., and Campbell, L. L. 1967. Comparison of the α -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. J. Bacteriol. 94(4):1131-1135.
- Xu, H., Jiang, M., Li, H., Lu, D., and Ouyang, P. 2005. Efficient production of poly (γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. Proc. Biochem. 40:519-523.

- Yahata, K., Sadanobu, J., and Endo, T. 1992. Preparation of poly- α -benzyl- γ -polyglutamate fiber. Polym. Prep. Jpn. 41:1077.
- Yamaguchi, F., Yoghihiro, O., Mamoru, K., Katsumi, U. and Hiroshi, M. 1996. Detection of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by SDS-PAGE. J. Biosci. Biotech. Biochem. 60:255-258.
- Yamanaka, S. 1991. New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. JP Patent 3047087.
- Ye, H., Jin, L., Hu, R., Yi, Z., Li, J., Wu, Y., Xi, X., and Wu, Z. 2006. Poly (γ ,L-glutamic acid) – cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice. Biomaterials. 27:5958-5965.
- Yokoi, H., Arima, T., Hirose, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y. 1996. Flocculation properties of poly (gamma-glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. J. Ferment. Bioeng. 82:84-87.
- 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. 79:378-380.
- Yoon, H. Y., Do, J., Lee, S. Y., and Chang, H. M. 2000. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. Biotechnol. Lett. 22:585-588.
- Zou, Y., Wu, Q. P., Tansey, W., Chow, D., Hung, M. C., Charnsangavej, C., Wallace, S., and Li, C. 2001. Effectiveness of water-soluble poly (L-glutamic acid)-camptothecin conjugate against resistant human lung cancer xenografted in nude mice. Int. Oncol. 18:331-336.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน(tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

3. อาหารเหลวกำหนดสูตร อ้างอิงจาก Xu และคณะ (2005)

กลูโคส	30.0	กรัม
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	30.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.1	กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

4. อาหารเหลวปรับปรุงสูตร

ซูโครส	35.0	กรัม
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	30.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	7.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.1	กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

5. Starch agar

Beef extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6. Potato Dextrose Agar

มันฝรั่งหั่นสด	200.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

1.1 สารละลาย Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 60.0 กรัมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 12.0 กรัม

โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เตรต 0.6 กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่น 3000 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 5.0 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย Lowry C

สารละลาย Lowry A 50 ส่วน

สารละลาย Lowry B 1 ส่วน

1.4 สารละลาย Lowry D

สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent) 1 ส่วน

ละลายในน้ำกลั่น 1 ส่วน

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.058 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายเซฟติลไทริติเนียม คลอไรด์ (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

เซฟติลไทริติเนียม คลอไรด์ (CPC) 10 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายที่ใช้สำหรับ Analytical Thin Layer Chromatography

4.1 เฟสเคลื่อนที่

สารละลายบิวทานอล	3	ส่วน
กรดอะซิติก	1	ส่วน
น้ำ	1	ส่วน

ผสมสารทั้งสามให้เข้ากัน จากนั้นผสมด้วยเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำ (63: 37 ปริมาตรต่อปริมาตร) ด้วยอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

4.2 สารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

นินไฮดรินเข้มข้น	0.2	กรัม
สารละลายอะซีโตน	100	มิลลิลิตร

5. สารละลายที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์ชนิดแผ่น

5.1 สารละลายทริสไกลซินอีเลคโตรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซิน	43.2	กรัม
ไซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.3

5.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8

5.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์

ทริส	24.2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8

5.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

ทริส	18.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.8

5.5 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 %

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

5.6 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 20 %

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

5.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.6	กรัม
Bis (N, N, -Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

5.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 20%	3.2	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-บีตา-เมอแคปโตเอทานอล	1.6	มิลลิลิตร
สารละลาย 5% บรอมฟีนอลบลู	0.2	มิลลิลิตร

5.9 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

5.10	สารละลายผสมของเซฟาราเรติงเจล 8 %		
	น้ำกลั่น	4.7	มิลลิลิตร
	สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
	สารละลายโซเดียมไดอะซิเตต 10%	100	ไมโครลิตร
	สารละลายอะคริลาไมด์		มิลลิลิตร
	TEMED	5	ไมโครลิตร
	สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%	50	ไมโครลิตร
5.11	สารละลายสแตกกิงเจล 4%		
	น้ำกลั่น	6.1	มิลลิลิตร
	สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
	สารละลายโซเดียมไดอะซิเตต 10%	100	ไมโครลิตร
	สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
	TEMED	10	ไมโครลิตร
	สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%	50	ไมโครลิตร
5.12	สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)		
	0.5% สีเมทิลีน บลู		
	3% กรดอะซิติก		

6. สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

6.1 สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$) 121.1 กรัม

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร

ละลาย Trismabase ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติม

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.2 สารละลาย EDTA เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์จนให้เข้ากันรอให้เย็นแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาณ 1000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.3 บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	โมลาร์
EDTA	1.0	โมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็นปริมาณ 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาณ 1000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.4 บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาณ 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาณ 1000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.5 สารละลาย CTAB/NaCl(10% CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.6 สารละลายฟีนอล

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมผง Hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาข้ามคืน ดูดัชนีฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดูสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างมากกว่าหรือเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

6.7 สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิมตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.8 สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 :1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.9 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

6.10 สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.11 สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.12 Lysis buffer I

น้ำตาลซูโครส 25 เปอร์เซ็นต์

TES บัฟเฟอร์ pH 8.0 ซึ่งประกอบด้วย

- 50 mM Trismabase
- 5.0 mM EDTA
- 50 mM NaCl

ผสมให้เข้ากันทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม ไลโซไซม์ (Lysozyme) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร



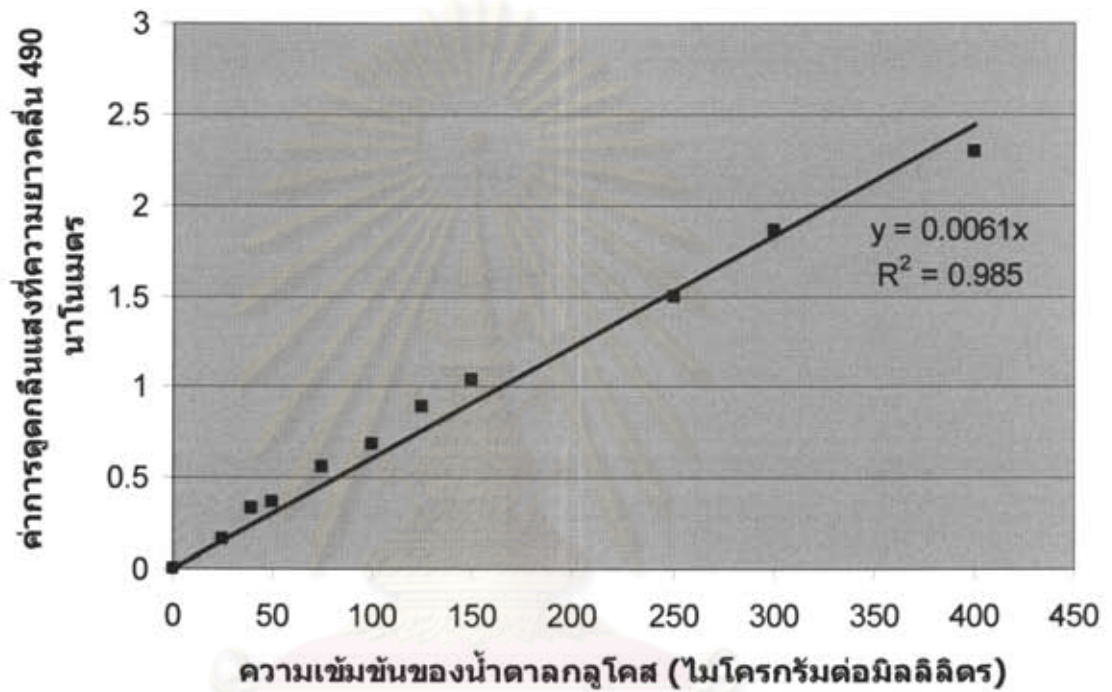
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

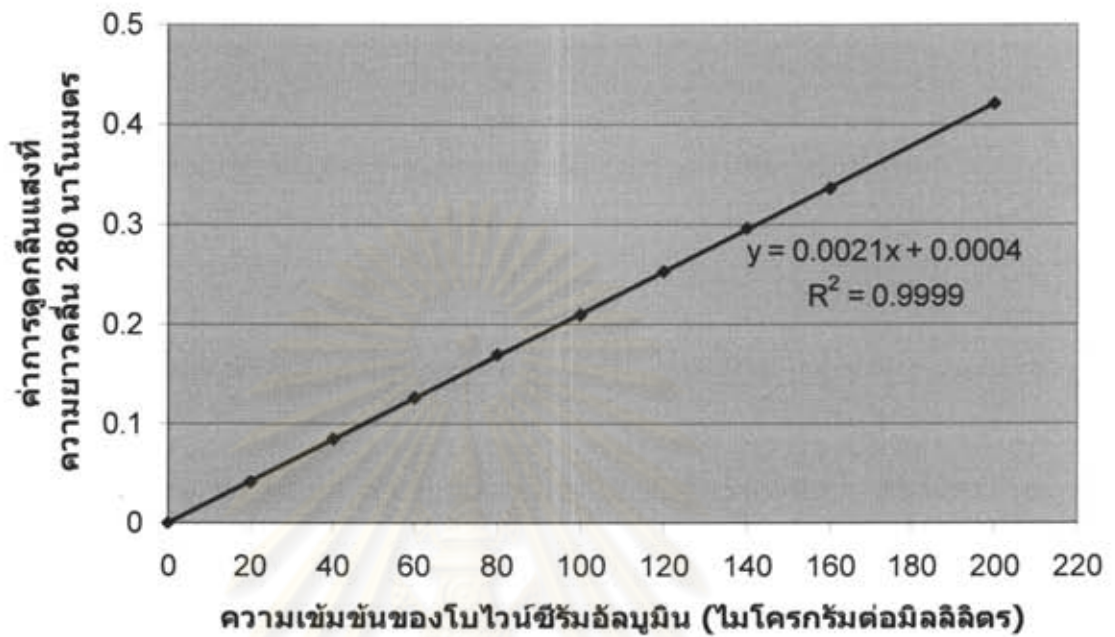
กราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

กราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ๑

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA แบบที่เรียสายพันธุ์ BA 13-0-1 จำนวน 1,457 เบส

5' GGGGGGCAGCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTG
 AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGG
 GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG
 TTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGTCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTCTTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAG
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACT
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGC
 TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC
 AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATT
 CGAAGCAAACGCGAAGAACCTTAGCCAGGCTCTTTGACATGCCCTCTGACAA
 TCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGT
 TGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA
 CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
 TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCG
 AGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC
 TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTTGT
 AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGAC
 3'

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสายทิพย์ เรืองมา เกิดเมื่อวันที่ 29 เมษายน พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2548 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย