



การคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
ที่ผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากอาหารหมักดองในประเทศไทย

Screening and Selecting of Exopolysaccharide Producing Lactic acid Bacteria
from Fermented Thai foods

พริณัฐ ตั้งธรรม¹ สุจยา ฤทธิศรี*¹ ณัฐวดี ลาพรหมมา¹ และ อัจฉรา ไชยวงศ์การ²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

²ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12110

*E-mail: ritthisorn_s@rmUTT.ac.th

บทคัดย่อ

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติสร้างเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide; EPS) จำนวน 300 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากอาหารหมักดองในประเทศไทย พบว่าไอโซเลท ที่ 23/14 จากแมลงม้นดอง จ.ลำปาง สามารถสร้าง EPS ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 16.166 กรัม/ลิตร เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* 96.6 และ 99.86% ตามลำดับ การทดสอบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS (แหล่งคาร์บอน : ซูโครส, กลูโคส, แมนโนส, ฟรุคโตส, แลคโตส และไซโลส) พบว่าน้ำตาลซูโครสสามารถส่งเสริมให้เชื้อผลิต EPS ได้สูงสุดมีปริมาณเท่ากับ 1.33 กรัม/ลิตร ขณะที่แหล่งคาร์บอนอื่นมีปริมาณ EPS ระหว่าง 0.36-0.45 กรัม/ลิตร เมื่อศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของ EPS ที่ผลิตจากน้ำตาลซูโครส ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ ชั้นบาง (thin layer chromatography; TLC) พบว่ามีน้ำตาลแมนโนส, กลูโคส, แมนโนส และฟรุคโตส

คำสำคัญ: เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์, ฟรีไบโอติก, แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

Received: August 03, 2016

Revised: April 11, 2017

Accepted: April 16, 2017

Abstract

The 300-isolated lactic acid bacteria from fermented foods in Thailand were screened for exopolysaccharide (EPS) producing. The results found that isolated No. 23/14 derived from fermented subterranean ants in Lampang province could produce the highest amount of EPS which the maximum rate was 16.17 g/L. The API 50 CH kits and 16S rDNA sequence were used for bacterial strain identification. The isolated No.23/14 showed the similar 16S rDNA sequence as *Lactobacillus fermentum* at 96.60% and 99.86% respectively. Six difference sugars (sucrose, glucose, mannose, fructose, lactose and xylose) were used for study the optimum carbon source for EPS producing. The best sugar could promote the highest EPS (1.33 g/L) as sucrose. Whereas, EPS yielded was about 0.36-0.45 g/L when using other carbon sources. Examination of monosaccharide composition in EPS produced from sucrose was analyzed by using thin layer chromatography, showed that the EPS was composed of rhamnose, glucose, mannose and fructose.

Keywords: Exopolysaccharide Prebiotic Lactic Acid Bacteria

1. บทนำ

จากภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีการผลิตและถนอมอาหารในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยทำให้เกิดความหลากหลายของชนิดอาหารมากมาย โดยเฉพาะอาหารหมักดอง ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ทั้งสี่ เช่น แหนม ปลาร้า ปลาซึ่ม สะตอดอง ร้าอึ่ง หอยดอง หน่อไม้ดอง แมงมันดอง และซิงดอง เป็นต้น และจากความหลากหลายของชนิดอาหารทำให้มีการค้นพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก (lactic acid bacteria; LAB) ได้มีการศึกษาหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในเรื่องของสุขภาพและได้ค้นพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ จึงเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า โพรไบโอติก (probiotic) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก [1]

นอกจากนี้ จุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์ยังมีคุณสมบัติในการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

(exopolysaccharide; EPS) ซึ่งเป็นสารที่หลั่งออกนอกเซลล์ [2] และมีการนำสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์นี้ไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ตัวอย่างเช่น ทางการแพทย์นำมาใช้เป็นสารเคลือบโมเลกุลของยา ทำให้การใช้อยามีประสิทธิภาพมากขึ้น [3] นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น นำมาทำให้อาหารมีเนื้อสัมผัสที่น่ารับประทานมากขึ้น [4] นำมาใช้ในเรื่องระบบสุขภาพทางเดินอาหาร เช่น ใช้เป็นกากใยอาหารเพื่อช่วยในการขับถ่าย และช่วยส่งเสริมจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก และกลุ่มโพรไบโอติก (probiotic) ในลำไส้ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น เรียกคุณสมบัตินี้ว่า โพรไบโอติก (prebiotic)

โพรไบโอติก คือสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารของเจ้าบ้านแต่จะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ และจะมีการนำเอาสารโพรไบโอติกไปใช้ในการเจริญ [5]

ดังนั้นจากความหลากหลายทางด้านอาหารหมักดองในประเทศไทยนี้เอง จึงเป็นจุดที่น่าสนใจในการศึกษาหาจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย

กรดแลกติก ที่มีคุณสมบัติสามารถผลิตสารเอ็กโซ-พอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อนำมาใช้เป็นสารพรีไบโอติกที่จะช่วยส่งเสริมจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง

กลุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองจาก 4 ภูมิภาคในประเทศไทย ตัวอย่างเช่น ปูดอง, หน่อไม้ดอง, แหนม, ไคปลาหมึก, ปลาต้ม, และรำอึ้ง เป็นต้น

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

ซั่งตัวอย่างอาหารหมักดองมาปริมาณ 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (De Man Rogosa and Sharpe broth) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเจือจางในน้ำกลั่นที่มีส่วนผสมของ sodium Chloride (NaCl) 0.85% โดยใช้ค่าเจือจางที่ 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มีส่วนผสมของ calcium carbonate (CaCO_3) 0.5% เก็บใน anaerobic jar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เกิดบริเวณใส นำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มีส่วนผสมของ CaCO_3 0.5% เก็บใน anaerobic jar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ

2.3 การจัดจำแนกระดับจีโนมของแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดองในประเทศไทย

ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายนอก และคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยอ้างอิงหลักเกณฑ์ ของ Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology (2009) [6] และเปรียบเทียบลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลกติกจีนส์ต่าง ๆ [7] ได้แก่ การตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างการจัดเรียงตัว การตรวจสอบกะตะเลส และการทดสอบการหมักน้ำตาลโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

2.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในระดับอนุชีวโมเลกุล

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดทดสอบ GF 1 Bacterial DNA extraction kit 100 preps (Vivantis) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 16s rDNA โดยใช้ universal primer (27 F) ทำการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดย agarose Gel มีความเข้มข้น 1.2% ย้อมใน 1X TAE buffer เปรียบเทียบขนาดโดยใช้ DNA marker Lambda/HindIII ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดทดสอบ Gene pH low™ Gel/PCR kit Protocol

2.5 การตรวจสอบการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ใส่ในอาหาร MRS broth ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครส 2% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนและส่วนใส จากนั้นทิ้งตะกอนเซลล์เก็บส่วนใสมาเติม ethanol 95% ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ หลังจากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

2.6 การตรวจวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

โดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี phenol sulfuric acid [8] และการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS method) [9]

การคำนวณหาน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar) น้ำตาลนอนรีดิวซ์ คือ น้ำตาลที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ โดยสามารถคำนวณได้จาก non-reducing sugar = total sugar - reducing sugar

2.7 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

นำเชื้อบริสุทธิ์ใส่ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส, กลูโคส, แมนโนส, กาแลคโตส, ฟรุคโตส และไซโลส 2% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และส่วนใส จากนั้นทิ้งตะกอนเซลล์เก็บส่วนใสมาเติม ethanol 95% ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์และส่วนใส นำตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการวิเคราะห์หาน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar)

2.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography : TLC)

ทำการย่อยพอลิแซคคาไรด์จากข้อ 2.8 ด้วยการเติมกรด trifluoroacetic acid (TFA) ความ

เข้มข้น 3 นอร์มัล ปริมาตร 225 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนใน heat box ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาได้กรดโดยการให้ความร้อนพร้อมกับเป่าให้อากาศจนกว่าค่า pH เป็นกลางนำสารละลายที่ได้มาตรวจวิเคราะห์น้ำตาล บนแผ่น TLC ควบคู่กับน้ำตาลมาตรฐานซูโครส, แลคโตส, กลูโคส, แมนโนส, รามโนส, ฟรุคโตส, กาแลคโตส, ไรโบส, ไซโลส และอะราบินอส โดยใช้ TLC silica gel 60 F254 เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้สารละลายที่ประกอบด้วย โพรพานอล 85% : น้ำ 15% (N-propanol 85% : water 15%) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ตรวจวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ปรากฏโดยนำแผ่น TLC มาพ่นด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 5% sulfuric acid ใน ethanol 95% อย่างรวดเร็ว รอให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที เปรียบเทียบแถบสีของน้ำตาลที่ปรากฏบนตัวอย่างกับแถบสีของน้ำตาลมาตรฐาน [10]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจาก

อาหารหมักดองในประเทศไทย

จากการคัดแยกเชื้อจากอาหารหมักดอง 44 ตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมด 300 ไอโซเลต โดยเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี

3.2 การทดสอบการสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid และ 3,5-Dinitrosalicylic acid

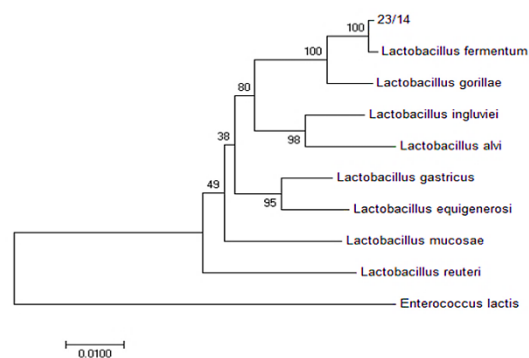
จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่เกิดวงใสบนจานเพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด 300 ไอโซเลต นำมาทดสอบการสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่ามี 162

ไอโซเลตที่สร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ คัดเลือกเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด 5 ไอโซเลต มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar) กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยใช้สูตรคำนวณ $\text{non-reducing sugar} = \text{total sugar} - \text{reducing sugar}$ พบว่า ไอโซเลต 23/14 มีปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 16.166 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 1)

3.3 การจัดจำแนกของแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดองในประเทศไทย

จากการศึกษาฐานวิธานพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงม้นดอง จ.ลำปาง ไอโซเลตที่ 23/14 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่นกลมมน มันวาว ผิวเรียบ และพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างท่อนสั้น ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการทดสอบกะตะเลส พบว่าให้ผลเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองอากาศเมื่อหยดสารละลาย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนี และจากการทดสอบการหมักน้ำตาลโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่ 23/14 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* ที่ระดับความเชื่อมั่น 96.6% การศึกษาในระดับอนุชีวโมเลกุล มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 1500 bp พบว่าไอโซเลตที่ 23/14 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ EzTaxon โดยระบุได้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.86% (รูปที่ 1)



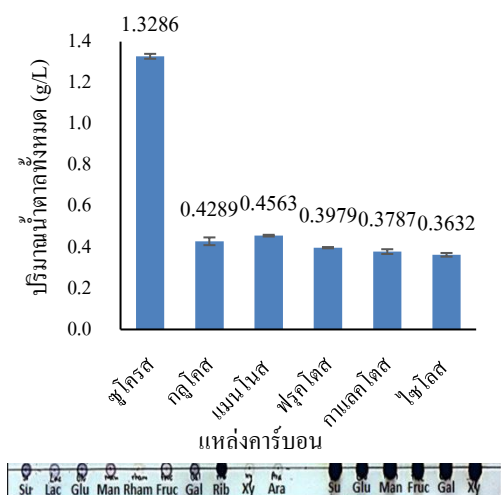
รูปที่ 1 phylogenetic tree ของไอโซเลต 23/14

ตารางที่ 1 ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharide; EPS)

ไอโซเลต	แหล่งที่มา	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/L)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	ปริมาณ EPS (g/L)
23/14	แมลงม้นดอง	16.557	0.391	16.166
23/17	แมลงม้นดอง	3.121	0.366 x 10 ⁻⁴	3.121
32/2	โคจิหมักน้ำเกลือ 40% 3 วัน	2.940	0.076	2.864
37/1	ขิงดอง	2.664	0.260 x 10 ⁻⁴	2.664
37N/16	ปลาสามปลาสวาย	4.228	0.023	4.205

3.4 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* 23/14 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส (Su), กลูโคส (Glu), แมนโนส (Man), ฟรุคโตส (Fru), กาแลคโตส (Gal) และไซโรส (Xy) และนำสารเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 1.3286, 0.4288, 0.4562, 0.3978, 0.3787 และ 0.3631 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2)

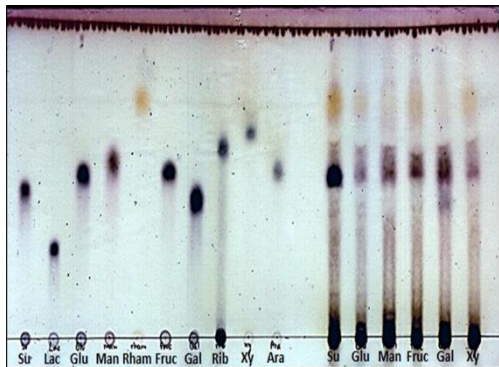


รูปที่ 2 กราฟปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tipparat *et al.*, 2012 [11] ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากปลาทะเล, หอย และกุ้ง ทำการทดสอบการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้าง เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส, ฟรุคโตส,

กลูโคส และแลคโตส ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในปริมาณสูงสุด จากเชื้อแบคทีเรีย *Weissella cibaria* Uga49

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography : TLC) พบว่าองค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* 23/14 จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มที่ 1 พบน้ำตาลฟรุคโตส (Fru), แมนโนส (Man), กลูโคส (Glu) และรามโนส (Rham) ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส (Su), ฟรุคโตส (Fru) และไซโรส (Xy) กลุ่มที่ 2 พบน้ำตาลฟรุคโตส (Fru), แมนโนส (Man) และกลูโคส (Glu) แต่ไม่พบน้ำตาลรามโนส (Rham) ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (Glu), แมนโนส (Man) และ กาแลคโตส (Gal) โดยแถบสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC (รูปที่ 3) แหล่งคาร์บอนน้ำตาลซูโครส (Su) คาดว่ามีแถบสีของน้ำตาลกลูโคส (Glu) และฟรุคโตส (Fru) ซ้อนทับกันอยู่ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Saravanan และ Prathap Kumar, 2015 [12] ทำการศึกษาองค์ประกอบของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จาก *Leuconostoc lactis* KC117496 ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองของประเทศอินเดีย โดยสารเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์นั้นมียาองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ผลจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสสามารถผลิตสารเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงที่สุด และมีองค์ประกอบของน้ำตาลที่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น



รูปที่ 3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography : TLC)

4. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซ-โพลีแซคคาไรด์จากอาหารหมักดองในประเทศไทย รวมทั้งหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ การทดลองพบว่า การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองในประเทศไทย 44 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 300 ไอโซเลต คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จำนวน 162 ไอโซเลต คัดเลือกเหลือเพียง ไอโซเลตที่ 23/14 จากอาหารแมลงม้นดอง จ.ลำปาง ที่มีปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดคือ 16.1662 กรัม/ลิตร จำแนกระดับจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกและการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลโดยการศึกษาชิ้น 16s rDNA พบว่าไอโซเลตที่ 23/14 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส ในฐานข้อมูลของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.86% แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คือน้ำตาลซูโครส โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* 23/14 โดย

ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสมีปริมาณเอ็กโซ-โพลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ 1.3286 กรัม/ลิตร และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography : TLC) พบว่าแหล่งคาร์บอนน้ำตาลซูโครส มีน้ำตาลรามโนสและน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความแตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่น

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965 . Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147: 747 -748. DOI:10.1126/Science. 147.3659. 747.
- [2] Magnuson, T. S. 2011 . How the xap locus put electrical “Zap” in *Geobacter* an exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk. *European Food Research and Technology*. pp. 119 - 125.
- [3] ศิริพร หมาดห้ำ, ภาวดี เมธะคานนท์, มานินี ประสิทธิ์ศิลป์ และกัญญวิมว์ กิรติกร. 2548. คุณสมบัติของโพลิเมอร์จากเชื้อราในประเทศไทย และศักยภาพในการเป็นวัสดุปิดแผล. รายงานวิจัยในโครงการ BRT ครั้ง

- ที่ 9. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 111 หน้า
- [4] Patel, S., Majumder, A., and Goyal, A. 2012. Potentials of exopolysaccharide from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*. 52(1): 3-12. DOI 10.1007/s12088-011-0148-8.
- [5] Rendueles, O., and Ghigo, J-M. 2012. Multispecies biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(5): 1-18 DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x
- [6] Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Secoond Edition. Volume Three. *The Firmicutes*. 2009.
- [7] Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. pp. 1 - 70. In Salminen, S. and Wright A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional Aspects. Marcel Dekker, New York. 617 p.
- [8] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 : 350 - 356.
- [9] Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31. 426 - 428.
- [10] Wang Q., Fang Y. 2004. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography B*. 812: 309-324.
- [11] Tipparat, H., Nantina, C., Santad, W., Sofia, K. and Robert A. R. 2012. In vitro prebiotic evaluation of exopolay-saccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydr. Polym.* 87: 846-852.
- [12] Saravanan, C. and Prathap K. H. S. 2015. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolate from idli batter. *International Journal of Biological Macro-molecules*. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.007.