



## ผลกระทบของ pH ต่อการสังเคราะห์ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ

### The effect of pH on levan synthesis from *Bacillus siamensis* using batch bio-reactor

วิวัฒน์ แจ้งเยี่ยม<sup>1</sup> สุภัก นาคทองคำ<sup>1</sup> พงษ์ธร เพ็งน้อย<sup>1</sup> ศุภศิลป์ ทวีศักดิ์<sup>1</sup> และโกสินทร์ ทีปักษ์พันธ์<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หลักสูตรรายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย สงขลา 90000

Witawat jangiam<sup>1</sup>, Suphak Nakthongkham<sup>1</sup>, Pongtorn Phengnoi<sup>1</sup>, Supphasin Thaweesak<sup>1</sup>,  
and Kosin Teeparuksapun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Burapha University, Chonburi, 20131

<sup>2</sup>Science Program, Department of General Education, Faculty of Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Songkhla, 90000

\*Corresponding Author: kosin.t@rmutsv.ac.th

Received: 8 January 2026/ Revised: 30 March 2026/ Accepted: 3 April 2026

#### บทคัดย่อ

ลิแวนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์จากซูโครสด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) โครงสร้างของลิแวนประกอบด้วยโมเลกุลฟรุกโตสเป็นสายหลัก ปลายสายหลักประกอบไปด้วยกลูโคส 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -(2,6) glycosidic มีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีเหลืองและสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน ลิแวนถูกใช้งานในด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมเคมีอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยที่ผ่านมา ลิแวนถูกสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจาก *Bacillus siamensis* ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยไม่มีการสังเกตและควบคุม pH ให้คงที่ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการสังเคราะห์ เพื่อตอบโจทย์ต่อการหมักแบบแม่นยำ (Precision fermentation) และการขยายกำลังการผลิต (Scale-up) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเปรียบเทียบระหว่างการสังเคราะห์ลิแวนโดยใช้ขวดรูปชมพู่กับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะที่มีการควบคุม pH เป็น 5.0 และไม่มีการควบคุม pH ต่อการสังเคราะห์ลิแวนด้วย *B. siamensis* ผลการทดลอง พบว่า การสังเคราะห์ลิแวนโดยใช้ขวดรูปชมพู่และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่สภาวะควบคุม pH เป็น 5.0 มีการเจริญของ *B. siamensis* สูงกว่าที่สภาวะไม่ควบคุม pH อย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ปริมาณลิแวนที่สังเคราะห์ในขวดรูปชมพู่และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะไม่ควบคุม pH มีปริมาณสูงกว่าในสภาวะที่ควบคุม pH เป็น 5.0 โดยสามารถผลิตลิแวนในขวดรูปชมพู่และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพได้สูงสุด 16.2 และ 21.8 % (w/v) ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

**คำสำคัญ:** เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ลิแวน พอลิแซ็กคาไรด์ *Bacillus siamensis*



## Abstract

Levan is a polysaccharide synthesized from sucrose by levansucrase. The structure consists of a fructose polymer as the main chain and a single glucose molecule at the terminal end, which is linked by  $\beta$ -(2, 6) glycosidic bonds. It appears as a white or yellow powder and is soluble in both water and oil. It is used in biotechnology and chemical industries. However, in previous study, levan was synthesized by levansucrase from *Bacillus siamensis* in a laboratory scale using 250 mL batch-flask. Throughout the synthesis process, the pH was not monitored or controlled. To address the challenges of precision fermentation and scale-up, this research focuses on comparing the synthesis of levan under pH-controlled and uncontrolled conditions, utilizing batch-flask and bioreactor to investigate the effects of maintaining a controlled pH of 5.0 versus uncontrolled pH conditions on levan synthesis by *B. siamensis*. The results showed that the levan biosynthesis using both batch-flask and bioreactor at controlled pH of 5.0 demonstrated the growth of *B. siamensis* greater than uncontrolled pH ( $p < 0.05$ ). On the contrary, the amount of levan produced using both batch-flask and bioreactor with uncontrolled pH were greater than controlled pH of 5.0, reaching 16.23 and 21.83 % (w/v) in batch-flask and bioreactor, respectively ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Bioreactor, Levan, Polysaccharide, *Bacillus siamensis*

## บทนำ

ลิแวนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์จากซูโครสด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) หรือเรียกว่า 6-fructosyltransferase โครงสร้างของลิแวนประกอบด้วยสายของฟรุกโตสเป็นสายหลัก ปลายสายหลักประกอบด้วยกลูโคส 1 โมเลกุล [1] ลิแวนสามารถพบและสังเคราะห์ได้จากหลายแหล่ง เช่น พืช ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นต้น [2] เอนไซม์ลิแวนซูเครสสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus johnsonii*, *L. gasserii*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum* และ *Streptococcus salivarius* เป็นต้น [1] จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus siamensis* จากถั่วเน่าซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสารพรีไบโอติกลิแวนได้อย่างมีประสิทธิภาพ [3]

ลิแวนถูกใช้งานในอุตสาหกรรมด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมเคมี เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ลิแวนจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอาหาร (สารเพิ่มปริมาณ สารคงตัว สารอิมัลซิไฟเออร์ และสารห่อหุ้ม) เครื่องสำอาง พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หรือใช้เป็นสารเคลือบวัสดุเพื่อเพิ่มความทนทานป้องกันการแตกหัก อนุพันธ์ของลิแวนถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม สังเคราะห์เป็นนาโนฟิล์ม [4, 5] ลิแวนมีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวหรือสีเหลือง มีโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -(2,6) glycosidic จึงส่งผลให้ลิแวนสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน แต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 75% [1] มีคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น มีความหนืดต่ำ มีความเสถียรต่อความร้อน ไม่เป็นพิษ ไม่ระคายเคือง มีความสามารถในการกักเก็บน้ำและสารเคมี และความเข้ากันได้ของสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น [6] ลิแวนยังมีคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่น มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการอักเสบ สารต้านการก่อมะเร็ง ต้านโรคเอดส์ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งน้ำตาลในกระแสเลือด เป็นต้น [7]

จากงานวิจัยที่ผ่านมา ลิแวนถูกสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจาก *B. siamensis* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยหมักในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm และ pH เริ่มต้นเป็น 6.0 [8] อย่างไรก็ตาม ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ลิแวนไม่มีการสังเกตและควบคุม pH ให้คงที่ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการหมัก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการสังเคราะห์ลิแวนโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะที่ควบคุมค่า pH เพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะที่มีการควบคุมและไม่มีการ



การควบคุมค่า pH ต่อการเจริญของ *B. siamensis* และการสังเคราะห์ลิแวน เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญเบื้องต้นในกระบวนการหมักแบบแม่นยำ (Precision fermentation) เพิ่มประสิทธิภาพ และขยายกำลังการผลิต (scale-up) ในเชิงอุตสาหกรรมและพาณิชย์

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### แบคทีเรีย

ทางผู้วิจัยได้คัดเลือกจุลินทรีย์ *B. siamensis* จากถั่วเน่าซึ่งเป็นอาหารทางภาคเหนือของประเทศไทย จากการวิจัยก่อนหน้า พบว่า *B. siamensis* สามารถผลิตลิแวนได้จากอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่ 20 % (w/v) [3] มีลักษณะเป็นแท่งขนาด 0.3–0.661.5–3.5 มิลลิเมตร เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก อยู่ในสกุลของ *Bacillus* อยู่ตามธรรมชาติทั่วไป [9] เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน โคโลนีมีสีขาวครีม เป็นเมือก โปร่งแสง [10]

#### อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

เตรียมอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) สำหรับคัดเลือกจุลินทรีย์ จากอาหาร NA สำเร็จรูป (Himedia, ประเทศอินเดีย) โดยมีส่วนประกอบของ NA 28 กรัมละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) 1 ลิตร เตรียมอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วย ซูโครส (Sucrose) 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (Yeast Extract) 5 กรัมต่อลิตร ทริปโทน (Tryptone) 10 กรัมต่อลิตร เกลือแกง (NaCl) 5 กรัมต่อลิตร และเตรียมอาหารสำหรับผลิตลิแวนซึ่งประกอบด้วย ซูโครส 300 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 3.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.8 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4$ ) 0.2 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) 3.5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 5.0 กรัมต่อลิตร นำอาหารทั้ง 3 ชนิด ไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส 15–20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 30 นาทีก่อนดำเนินการเลี้ยงจุลินทรีย์

#### การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

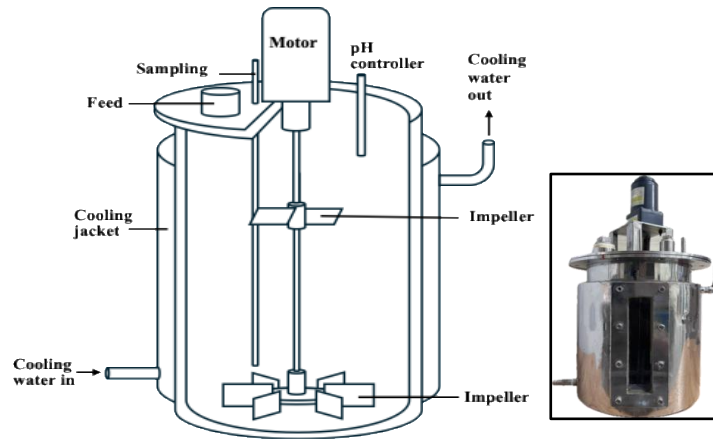
นำ *B. siamensis* ที่เก็บในกลีเซอรอลด้วยอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) เพื่อใช้คัดเลือกจุลินทรีย์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ 1 โคโลนี เลี้ยงลงในอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

#### ผลกระทบของสภาวะ pH ที่ถูกควบคุมและไม่ควบคุมต่อการผลิตสารลิแวนด้วย *B. siamensis*

นำจุลินทรีย์ *B. siamensis* ที่ได้จากการหมักในอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ 20 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวเพื่อผลิตลิแวนปริมาตร 180 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทำการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เป็น 5.0 และปรับ pH ให้คงที่ด้วย HCl/NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ ทุก ๆ 6 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมงของการหมัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) และตรวจสอบปริมาณของลิแวนและน้ำตาลด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) จากนั้นทำการทดลองซ้ำโดยไม่ปรับ pH ในระหว่างการหมักพร้อมวัดค่า pH ระหว่างการหมัก

#### การผลิตสารลิแวนจาก *B. siamensis* ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

นำจุลินทรีย์ที่ได้จากการหมักในอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ 200 มิลลิลิตร เลี้ยงลงในอาหารสำหรับผลิตลิแวน 1800 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ภาพที่ 1) (ปริมาตรการทำงาน 2 ลิตร) ที่ประกอบด้วยใบพัดแบบใบพัดพิทช์ (Pitch blade impeller) ขนาด 4 เซนติเมตร 2 ใบพัด และ ใบพัดแบบรัสตัน (Rushton turbine) ขนาด 4 เซนติเมตร 6 ใบพัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนเวียน ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กวนด้วยความเร็วรอบ 200



ภาพที่ 1 แบบจำลองเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

รอบต่อหน้าที่ ติดตามและทำการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เป็น 5.0 และปรับ pH ให้คงที่ด้วย HCl/NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมงของการหมัก วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD600) และตรวจสอบปริมาณของกลีโคเจนและน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC จากนั้นทำการทดลองซ้ำโดยไม่ทำการปรับ pH ในระหว่างการหมักพร้อมตรวจวัดค่า pH ระหว่างการหมัก นำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาล (ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส) และปริมาณกลีโคเจนที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis ; ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ  $p\text{-value} = 0.05$

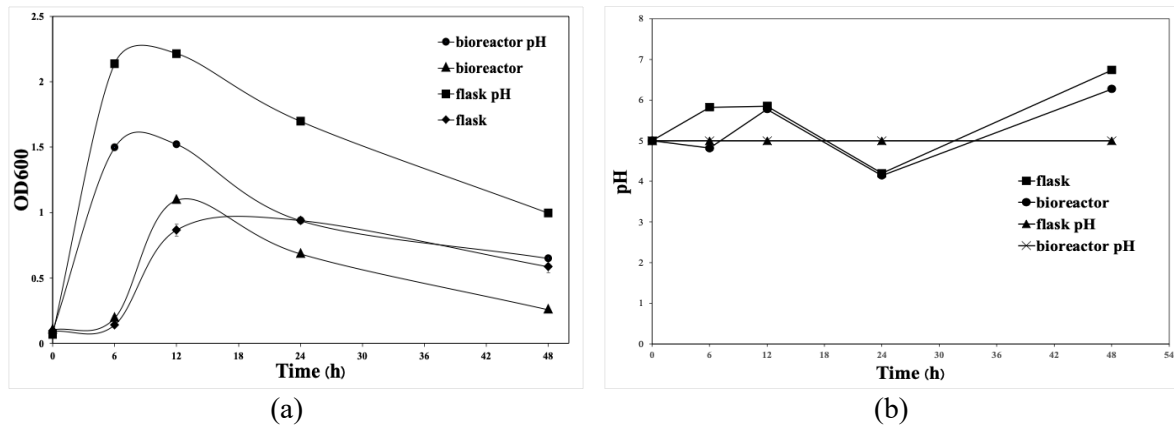
#### การวิเคราะห์ปริมาณกลีโคเจนและน้ำตาล ด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างที่เก็บจากกระบวนการหมักไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ  $9,100 \times g$  เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ ทำการวิเคราะห์น้ำตาลในส่วนใสด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-20A series, Shimadzu Corporation, Japan) ผ่านคอลัมน์ Phenomenex NH<sub>2</sub> ตรวจวัดด้วย refractive index detector ใช้ 80% อาซีโตไนไตรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์กลีโคเจนจะใช้คอลัมน์ TOSOH TSKgel amide-80 size exclusion ตรวจวัดด้วย refractive index detector โดยใช้ 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis ; ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ  $p\text{-value} = 0.05$

#### ผลการวิจัย

##### อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ *B. siamensis*

จากขั้นตอนการศึกษาการหมักจุลินทรีย์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและในขวดรูปชมพู่โดยที่มีการควบคุม pH ที่ 5.0 โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงและปรับ pH ด้วย 1 โมลาร์ HCl และ 1M NaOH ทุก 6 ชั่วโมง โดยค่า OD600 ที่แสดงถึงการเจริญของจุลินทรีย์ *B. siamensis* แสดงดังภาพที่ 2(a) โดยพบว่า *B. siamensis* สามารถเจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential growth phase) เป็นระยะที่ *B. siamensis* มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและต่อเนื่องได้ภายในระยะเวลาหมัก 6 ชั่วโมง โดยมีช่วงระยะในการปรับตัว (Lag phase) น้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การปรับตัวของจุลินทรีย์ หรือการใช้จุลินทรีย์ที่พร้อมสำหรับการเจริญทันที รวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า จุลินทรีย์ที่ผลิตกลีโคเจนส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วง pH 5.0 ถึง 6.5 ที่ 6-12 ชั่วโมงของการหมัก และมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเริ่มพบการเจริญแบบคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป [11] สำหรับการผลิตกลีโคเจนในสภาวะที่ไม่มี

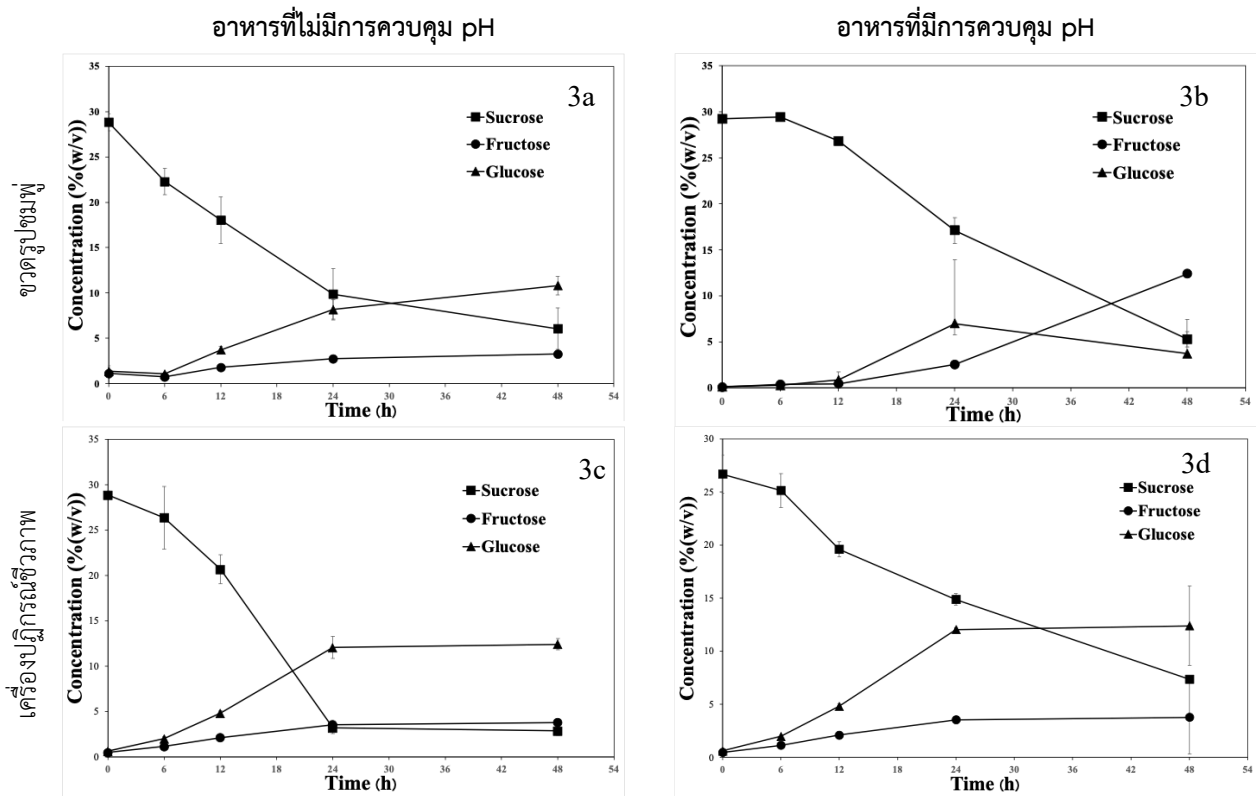


ภาพที่ 2 การเจริญของจุลินทรีย์ *B. siamensis* ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีควบคุมค่า pH ระหว่างกระบวนการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและขวดรูปชมพู่ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (a) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) เพื่อใช้ประเมินการเจริญของจุลินทรีย์ (b) แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ตลอดกระบวนการหมัก เพื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพของสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

การควบคุมค่า pH นั้น การเจริญของ *B. siamensis* สามารถแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยช่วงแรก *B. siamensis* จะแสดงระยะปรับตัว (Lag phase) เนื่องจากเป็นช่วงที่ *B. siamensis* ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของอาหารเลี้ยง ก่อนเข้าสู่ช่วงถัดไปซึ่งเป็นระยะการเจริญอย่างรวดเร็ว (Log phase) โดยค่า OD600 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจาก 12 ชั่วโมงของการหมัก พบว่า การเจริญของ *B. siamensis* จะเข้าสู่ระยะคงตัว (Stationary phase) เนื่องจากปริมาณสารอาหารลดลงสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครสที่มีปริมาณลดลง และน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 3 และพบว่าค่า OD600 ลดลงเล็กน้อย เนื่องจาก *B. siamensis* เริ่มเข้าสู่ระยะการตาย (Death phase) อันเป็นผลมาจากการขาดแคลนอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ [12] และในขณะที่การเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพไม่พบช่วง Stationary phase อย่างชัดเจนนั้น เนื่องจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดพื้นที่อับ (Dead zones) ที่เกิดขึ้นในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งส่งผลกระทบต่อกิจกรรมและการเจริญของจุลินทรีย์ ส่งผลให้อัตราการเจริญในช่วง Stationary phase ไม่ชัดเจน โดยมีค่า OD600 ในช่วง 12-24 ชั่วโมงมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง นอกเหนือจากนี้ ยังพบตะกอนของจุลินทรีย์บริเวณพื้นที่อับ ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการกวนผสมที่ไม่ดี จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตลิแวนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพลดลง [13] จากการวิเคราะห์กราฟการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในภาพที่ 2(b) ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่าในการทดลองที่ไม่มีควบคุมค่า pH ทั้งในขวดรูปชมพู่และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกัน โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก ค่า pH มีความผันผวนเล็กน้อยก่อนจะลดลงมาอยู่ที่ประมาณ pH 4.0 ซึ่งเป็นผลจากการสะสมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในช่วงการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม หลังจากชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ค่า pH ของทั้งสองสภาวะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 48 ค่า pH ในขวดรูปชมพู่และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพพุ่งสูงขึ้นไปอยู่ที่ 6.7 และ 6.2 ตามลำดับ

#### ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและลิแวน ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

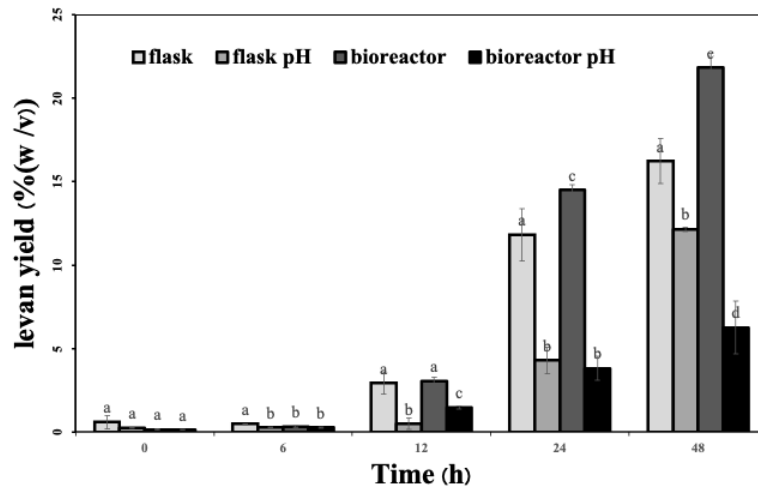
จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. siamensis* ในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของซูโครส 30 % (w/v) เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ แสดงดังภาพที่ 3 น้ำตาลซูโครสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 6-24 ชั่วโมงของการหมักที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก พบว่า การผลิตลิแวนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและขวดรูปชมพู่ที่มีการควบคุม pH เหลือน้ำตาลซูโครส 7.36 และ 5.29 % (w/v) ตามลำดับ และที่ไม่มีควบคุม pH เหลือน้ำตาลซูโครส 2.85 และ 6.06 % (w/v) ตามลำดับ แนวโน้มการลดลงของน้ำตาลซูโครสมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสที่เกิดขึ้น



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของน้ำตาล (ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส) จากการหมักจุลินทรีย์ *B. siamensis* ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH ด้วยขบวนการหมัก (3a) เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (3c) และภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม pH ด้วย ขบวนการหมัก (3b) เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (3d) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาล

ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก โดยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพพบกลูโคส 7.06 % (w/v) และ ฟรุกโตส 4.65 % (w/v) ในขณะที่ขบวนการหมักที่มีการควบคุม pH พบกลูโคส 3.71 % (w/v) และฟรุกโตส 12.28 % (w/v) สำหรับระบบการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH พบว่า การหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบ กลูโคสและฟรุกโตส 12.40 % (w/v) และ 3.77 % (w/v) ตามลำดับ ในขณะที่การหมักด้วยขบวนการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH พบ กลูโคสและฟรุกโตส 10.82 % (w/v) และ 3.26 % (w/v) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณของลิแกนด์ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตภายใต้สภาวะการควบคุมและไม่ควบคุมค่า pH ในระบบขบวนการหมัก และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า สภาวะการหมักส่งผลต่อปริมาณลิแกนด์แสดงในภาพที่ 4 โดยช่วงเริ่มแรกที่ 0-6 ชั่วโมง พบว่าปริมาณลิแกนด์ที่ผลิตได้จาก *B. siamensis* ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้อยมากและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เนื่องจาก *B. siamensis* อยู่ในระยะปรับตัว (Lag phase) อย่างไรก็ตาม เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก เริ่มสังเกตเห็นความแตกต่างของปริมาณลิแกนด์อย่างชัดเจน โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ทั้งในขบวนการหมักและเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ให้ผลผลิตลิแกนด์สูงกว่าสภาวะที่มีการควบคุมค่า pH อย่างมีนัยสำคัญ (2.94% และ 3.05% (w/v) ตามลำดับ) เมื่อการหมักดำเนินไปถึง 24 ชั่วโมง ปริมาณลิแกนด์ในทุกสภาวะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของจุลินทรีย์และการลดลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 2 และ 3) โดยในระยะนี้ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะไม่ควบคุมค่า pH ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 14.50% (w/v) ตามด้วยขบวนการหมักในสภาวะไม่ควบคุมค่า pH ที่ 11.82% (w/v) ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ให้ผลผลิตต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) กระบวนการหมักที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะไม่ควบคุมค่า pH เป็นสภาวะที่ให้ผลผลิตลิแกนด์สูงสุดเท่ากับ 21.8% (w/v) ซึ่งสูงกว่า



**ภาพที่ 4** ความเข้มข้นของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *B. siamensis* ในสภาวะที่มีการควบคุม pH เป็น 5.0 และไม่มีการควบคุม pH ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและขวดรูปชมพู่ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณลิแวน (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )

การหมักในขวดรูปชมพู่ที่ไม่ควบคุมค่า pH (16.2% w/v) อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้าม การควบคุมค่า pH ส่งผลให้ปริมาณของลิแวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยเฉพาะในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการควบคุมค่า pH ซึ่งให้ผลผลิตเพียง 6.3% (w/v) และการหมักด้วยขวดรูปชมพู่สามารถผลิตลิแวนได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก โดยสามารถผลิตลิแวนได้ 12.1 % (w/v)

#### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

**ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและลิแวน ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)**  
จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. siamensis* ในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของซูโครส 30 % (w/v) เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ แสดงดังภาพที่ 3 น้ำตาลซูโครสลดลงเล็กน้อยในช่วงแรก (0-6 ชั่วโมง) ในทุกรูปแบบของการหมักเนื่องจากอยู่ในช่วงปรับตัวและมีการใช้สารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์น้อย การลดลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสและการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสในระบบกระบวนการหมักนั้น เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *B. siamensis* เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนซูโครสให้เป็นลิแวน โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถสังเกตได้จากการลดลงของปริมาณซูโครสทั้งในระบบการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและขวดรูปชมพู่ โดยการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของซูโครสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส และเกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิเลชัน (Transfructosylation) ที่นำฟรุกโตสซึ่งได้จากการไฮโดรไลซิสมาสร้างเป็นลิแวน [14] โดยความแตกต่างของสัดส่วนของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสที่เกิดขึ้นสามารถบ่งชี้การสังเคราะห์ลิแวนได้เช่นกัน [1] รูปแบบการเจริญเติบโตของ *B. siamensis* มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยในช่วงแรก ที่มีการแบ่งตัวสูงสุด (log phase) จะเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลให้ค่า pH ลดลงต่ำสุดที่ชั่วโมงที่ 24 จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้โดยการสะสมกรดอินทรีย์และการเปลี่ยนแปลง pH ในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งระบุว่าคาร์โบไฮเดรต (เช่น น้ำตาล) เป็นปัจจัยหลักที่ถูกแปลงเป็นกรดอินทรีย์ในช่วงของการเจริญเติบโต นำไปสู่การลดลงของค่า pH [15] และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในช่วง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งช่วงเป็นเจริญของ *B. siamensis* เริ่มเข้าสู่ระยะการตาย (Death phase) ดังที่ภาพที่ 2(a) เป็นสัญญาณว่าแหล่งคาร์บอนหลักอย่างน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มถูก



ใช้จนหมด ส่งผลให้เมแทบอลิซึมของ *B. siamensis* เปลี่ยนทิศทางการสลายน้ำตาลเพื่อสร้างกรดอินทรีย์ ไปเป็นการสลายแหล่งไนโตรเจนหรือโปรตีนที่เหลืออยู่แทนผ่านกระบวนการ Deamination ซึ่งจะปลดปล่อยสารประกอบแอมโมเนียที่มีฤทธิ์เป็นด่างออกมาสู่ภายนอกเซลล์ [16]

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis ; ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ  $p\text{-value} = 0.05$  พบว่า หลังสิ้นสุดกระบวนการผลิต ปริมาณของลิแวนที่ได้จากการผลิตที่มีการควบคุม pH นั้นมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติกับปริมาณของลิแวนที่ได้จากการผลิตที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ซึ่งบ่งชี้ว่าการควบคุม pH เป็น 5.0 อาจไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตลิแวน ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยเอนไซม์ลิแวนซูเครสสามารถทำงานได้ดีที่ pH 6.0 [14] นอกเหนือจากนี้ ในระหว่างกระบวนการหมัก pH ของระบบอาจมีเปลี่ยนแปลงจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ และ pH อาจเพิ่มขึ้นสูงกว่า pH 5.0 ได้ ซึ่งส่งผลให้กระบวนการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH มีประสิทธิภาพในการผลิตลิแวนได้สูงกว่ากระบวนการหมักที่มีการควบคุม pH ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่เคยมีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ งานวิจัยดังกล่าวระบุว่า ในกระบวนการเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. licheniformis* NS032 ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH พบว่า แนวน้ำที่จุลินทรีย์จะผลิตลิแวนในปริมาณที่สูงที่สุดจะเกิดขึ้นในช่วงที่ค่า pH สูงกว่า 5.0 ทั้งนี้ การเพิ่มขึ้นของ pH ในระหว่างกระบวนการหมักอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิแวนให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น [17] และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Anam Nasir และคณะ ที่หมักจุลินทรีย์ *B. aryabhatai* แล้วพบว่า อาหารสำหรับการผลิตลิแวนที่มี pH มากกว่า 5.0 สามารถผลิตลิแวนได้เพิ่มขึ้น [18]

การสังเคราะห์ลิแวนโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะที่ควบคุมค่า pH เพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะที่มีการควบคุมและไม่มีการควบคุมค่า pH ต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของ *B. siamensis* และสังเคราะห์ลิแวน ในอัตราการเพิ่มขึ้นของ *B. siamensis* มีอัตราการเพิ่มขึ้นที่สูงสุดในรูปแบบการเลี้ยงในรูปขมพูโดยมีการควบคุมค่า pH ที่ 5.0 และในรูปแบบการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการควบคุมค่า pH ที่ 5.0 มีอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อเป็นอันดับต่อมา เนื่องจาก *B. siamensis* มีปัจจัยในการควบคุมค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการสังเคราะห์ลิแวนของ *B. siamensis* ในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 30 % (w/v) มีปริมาณลิแวนที่สูงสุดในรูปแบบการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพอยู่ที่ 21.8 % (w/v) จากการทดลองรูปแบบการทดลองในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ช่วยให้สามารถผลิตลิแวนได้ในปริมาณที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม เพราะสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆที่มีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และอีกทั้งมีการออกแบบที่ช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ทำให้ตอบสนองความต้องการของอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ เทคโนโลยีนี้เหมาะสำหรับการขยายขนาดการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ทำให้สามารถผลิตพรีไบโอติกส์เชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มค่า โดยการวิจัยในอนาคตนั้นแนะนำให้ศึกษาการควบคุมปัจจัยอื่นอีก เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออกซิเจน และการกวนผสม เป็นต้น ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มอัตราการเจริญของจุลินทรีย์และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตลิแวนให้ได้ปริมาณมากและสม่ำเสมอ

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิศวกรรมศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการดำเนินงานวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

1. Srikanth R, Reddy CHS, Siddartha G, Ramaiah MJ, Uppuluri KB. Review on production, characterization and applications of microbial levan. Carbohydr Polym 2015;120:102-14.
2. Jang KH, Kang SA, Cho Y, Kim YY, Lee YJ, Hong K, et al. Prebiotic properties of levan in rats. J Microbiol Biotechnol 2003;13(3):348-53.



3. Thakham N, Thaweesak S, Teerakulkittipong N, Traiosot N, Kaikaew A, Lirio GA, et al. Structural characterization of functional ingredient Levan synthesized by *Bacillus siamensis* isolated from traditional fermented food in Thailand. *International Journal of Food Science*. 2020;2020(1):7352484.
4. Sima F, Mutlu EC, Eroglu MS, Sima LE, Serban N, Ristoscu C, et al. Levan nanostructured thin films by MAPLE assembling. *BOMAF6* 2011;12(6):2251-6.
5. Anguluri K, La China S, Brugnoli M, De Vero L, Pulvirenti A, Cassanelli S, et al. Candidate acetic acid bacteria strains for levan production. *Polymers* 2022;14(10):2000.
6. Silbir S, Dagbagli S, Yegin S, Baysal T, Goksungur Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr Polym* 2014;99:454-61.
7. Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H, Mejdoub H. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol* 2011;49(5):942-7.
8. Phengnoi P, Sattavanich S, Charoensup C, Nuengnoon S, Janthorn K, Teerakulkittipong N, et al. Production and characterization of levan by *Bacillus siamensis* at flask and bioreactor. *EAEF* 2023;16(1):15-23.
9. Meidong R, Doolgindachbaporn S, Jamjan W, Sakai K, Tashiro Y, Okugawa Y, et al. A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (Phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *J Gen Appl Microbiol* 2017;63(4):246-53.
10. Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, Visessanguan W. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60(10):2364-70.
11. El-Refai HA, Abdel-Fattah AF, Mostafa FA. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25(5):821-7.
12. Maier RM, Pepper IL. Bacterial growth. *Environ. Microbiol: Elsevier*; 2015. p. 37-56.
13. Amin I, Elsakka M, Oterkus S, Nguyen CT, Ozdemir M, El-Aassar A-H, et al. Computational fluid dynamics-based design of anoxic bioreactor zone in wastewater treatment plant. *Desalin. Water Treat* 2022;253:9-23.
14. Phengnoi P, Thakham N, Rachphirom T, Teerakulkittipong N, Lirio GA, Jangiam W. Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *Heliyon* 2022;8(12) e12137.
15. Garrote Achou C, Cantalejo Díez MJ, Diaz Cano J, Molinos Equiza X. Evaluation of different nutritional sources in lactic acid bacteria fermentation for sustainable postbiotic production. *Foods* 2025;14(4):649.
16. Zhao CC, Eun JB. Isolation and identification of hyper-ammonia-producing bacteria from commercial fermented skates (*Raja kenoi*). *J Food Sci Technol* 2018;55(12):5082-90.
17. Gojgic-Cvijovic G, Jakovljevic D, Loncarevic B, Todorovic N, Pergal MV, Ciric J, et al. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *Int J Biol Macromol* 2019;121:142-51.
18. Nasir A, Sattar F, Ashfaq I, Lindemann SR, Chen M-H, Van den Ende W, et al. Production and characterization of a high molecular weight levan and fructooligosaccharides from a rhizospheric isolate of *Bacillus aryabhatai*. *LWT* 2020;123:109093.