ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่จากแบคทีเรียอะซิติกตรึงไนโตรเจน *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3

A Novel Exopolysaccharides from Nitrogen Fixing Acetic Acid Bacterium, *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3

สาฐิณี เจือจันทร์[1] วัลลภา หล่อเหลี่ยม[2] ศิรพรรณ สุคนธสิงห์[3] สมพร มูลมั่งมี[4] และ ดวงทิพย์ มูลมั่งมี[1*]

Satinee Juechan[1], Wanlapa Lorliam[2], Sirapan Sukontasing[3], Somporn Moonmangmee[4] and Duangtip Moonmangmee[1*]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10140

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110

[3]ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

[4] ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140, THAILAND

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, THAILAND

[3]Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, THAILAND

[4]Biodiversity Research Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathumthani 12120, THAILAND

[*]Corresponding author e-mail: duangtip.moo@kmutt.ac.th

ARTICLE INFO

Article history:

Received: June 20, 2022

Revised: August 16, 2022

Accepted: August 22, 2022

Available online: September 8, 2022

DOI: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

ABSTRACT

An acetic acid bacterium, *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3 was isolated from rice rhizosphere and exhibited nitrogen fixation as well as plant growth promotion properties. In addition, the bacterium can produce exopolysaccharides (EPS) to promote nitrogenase activity in the bacterial cells. These research objectives were aimed to purify and characterize EPS generated from an acetic acid bacterium, *N. vanlangensis* AR-R3. The pure culture was inoculated in Glucose-Yeast Extract-Peptone (GYP) medium broth

Keywords: acetic acid bacteria, exopolysaccharides (EPS), Column Chromatography, Nguyenibacter vanlangensis AR-R3

(2% Glucose, 0.5% Yeast Extract, and 1% Peptone). The obtained culture supernatant was concentrated using a rotary evaporator, and then crude exopolysaccharides were precipitated with absolute ethanol. Crude polysaccharides were further purified via DEAE- Sephacel Column Chromatography and Sephacryl™ S-400 Column Chromatography, respectively. According to the results of the study, exopolysaccharides purified from *N. vanlangensis* AR-R3 exhibited 4 average molecular weight sizes (Mw) of 2.180×10^8, 5.638×10^6, 5.523×10^5 and 1.990×10^5 Da, respectively. Sugar composition analysis of all 4 polysaccharides revealed the same composition of two types of monosaccharides, glucose and mannose. Regarding to purified exopolysaccharides from *N. vanlangensis* AR-R3 had molecular weights and monosaccharide compositions difference from other acetic acid bacteria reported so far. Thus, exopolysaccharide purified in this research would be a novel polysaccharide.

บทคัดย่อ

Nguyenibacter vanlangensis AR-R3 เป็นแบคทีเรียอะซิติกที่แยกมาจากรากของต้นข้าว มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ออกมานอกเซลล์เรียกว่า Exopolysaccharides (EPS) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในเซลล์แบคทีเรีย ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกบริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียอะซิติก *N. vanlangensis* AR-R3 จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์มาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Glucose-Yeast Extract-Peptone: GYP (2% Glucose, 0.5% Yeast Extract และ 1% Peptone) โดยนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture Supernatant) มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary Evaporator และตกตะกอนเอ็กโซพอลิ-แซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลไร้น้ำ (Absolute Ethanol) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์โดยผ่าน DEAE-Sephacel Column Chromatography และ Sephacryl™ S-400 Column Chromatography ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ *N. vanlangensis* AR-R3 ผลิตได้มีทั้งหมด 4 ขนาด คือ มีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) เฉลี่ยเท่ากับ 2.180×10^8, 5.638×10^6, 5.523×10^5 และ 1.990×10^5 ดาลตัน การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ชนิด พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) 2 ชนิดเหมือนกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และ แมนโนส เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ของ *N. vanlangensis* AR-R3 มีน้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแตกต่างไปจากรายงานของแบคทีเรียอะซิติกชนิดอื่น ดังนั้นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกบริสุทธิ์จากงานวิจัยนี้จึงเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่

คำสำคัญ: แบคทีเรียอะซิติก เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ คอลัมน์-โครมาโตกราฟี *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

บทนำ

แบคทีเรียอะซิติกจัดเป็นสกุลแบคทีเรียในวงศ์ Acetobacteraceae ชั้น Alphaproteobacteria มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน หรือกลมรี (Ellipsoidal or Rod Shape) ติดสีแกรมลบ (Gram-negative) เป็นแอโรบิกแบคทีเรีย (Aerobic Bacteria) เนื่องจากต้องใช้ออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโต [1] มีแฟลกเจลล่าเป็นแบบ Peritrichous หรือ Polar ขึ้นอยู่กับสกุลของแบคทีเรียอะซิติก สามารถพบแบคทีเรียอะซิติกในพืช โดยเฉพาะในดอกไม้ ผลไม้ รวมถึงรากพืช ในอดีตวงศ์ Acetobacteraceae ประกอบด้วย 2 สกุล คือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ต่อมามีการรายงานค้นพบเพิ่มเติมรวมทั้งหมด 14 สกุล ได้แก่ *Acetobacter, Ameyamaea, Asaia, Gluconobacter, Gluconacetobacter, Acidomonas, Kozakia, Komagataeibacter, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia, Granulibacter, Nguyenibacter* และ *Tanticharoenia* [2] โดยสกุลที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Swaminathania* [3] *Komagataeibacter*, *Asaia* และ *Nguyenibacter* [4] แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่มีความสามารถสังเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญสำหรับสร้างเป็นฟิล์ม (Biofilm) ห่อหุ้มเซลล์และยังเป็นตัวช่วยให้แบคทีเรียสามารถเข้าสู่ในพืชได้ [5] การสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียอะซิติกมักพบได้ทั้ง Homopolysaccharides หรือ Heteropolysaccharides ซึ่งในแบคทีเรียอะซิติกบางสกุลสร้างพอลิแซ็กคาไรด์บริเวณผิวเซลล์ (Cell Surface) เรียกว่า Capsular Polysaccharides (CPS) โดยจัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ยึดติดกับเซลล์ (Cell-Attached Polysaccharides) และแบคทีเรียอะซิติกบางสกุลพบการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ และสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจัดเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS) จากการศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนสกุล *Acetobacter tropicalis* SKU 1100 พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด Cell-Attached Polysaccharides แบบ Heteropolysaccharides ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และแรมโนส [6] แบคทีเรียอะซิติกสกุล *Asaia* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ ได้แก่ *A. bogorensis* และมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนด้วย [7] โดย *A. bogorensis* NRIC 0311^{T} สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato-Glycerol-Calcium Carbonate ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และแรมโนส [8] และเมื่อทำการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีองค์ประกอบเปลี่ยนไปจากเดิม โดยสามารถผลิตฟรุกแทน (Fructan) ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียง 1 ชนิดคือน้ำตาลฟรุกโตส [9] นอกจากนี้ยังพบการรายงานว่าแบคทีเรียอะซิติก *A. siamensis* MTCC 4042^{T} สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นกัน [7] พอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียอะซิติกตรึงไนโตรเจนที่ผลิตขึ้นมานอกเซลล์ใช้สำหรับช่วยให้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ดี โดยมีหน้าที่ป้องกันการแพร่ของออกซิเจนเข้าสู่ภายในเซลล์ไม่ให้กระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่มีความว่องไวต่อออกซิเจน [10]

แบคทีเรียสกุล *Nguyenibacter* จัดเป็นแบคทีเรียอะซิติกที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ ถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศเวียดนามโดยทำการคัดแยกเชื้อมาจากดินบริเวณรอบรากข้าว (Rhizosphere) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-Free LGI medium ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจน สามาถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ลีแวน (Levan) ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-Free LGI medium ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน [11] นอกจากนี้ยังจัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria) [12] นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียอะซิติกตรึงไนโตรเจน สามารถช่วยให้แบคทีเรียเข้าสู่รากพืชได้ โดย

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

มีรายงานพบว่า *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส และมีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระได้ด้วย นอกจากนี้เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้นั้นยังช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลอง และในระหว่างการเข้าสู่รากของต้นข้าวของแบคทีเรีย *G. diazotrophicus* Pal5 ข้าวจะสร้างสารอนุมูลอิสระ (Free Radical) ออกมาซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียอะซิติก [13] แต่เอ็กโซ-พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้นั้นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถทำลายอนุมูลอิสระที่พืชสร้างได้ จากรายงานการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในแบคทีเรียอะซิติก *A. xylinum* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเซลลูโลสเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน [14] เซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียอะซิติกมีความบริสุทธิ์สูง ทนต่อแรงดึงสูง รูปร่างมีความคงตัว ความหนาแน่นของผลึกสูง และมีปริมาณน้ำสูง ทำให้มีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดและใช้เป็นสารให้ความคงตัวในอาหาร [15] และใช้เป็นวัสดุในการตกแต่งแผล [16]

อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ของ *N. vanlangensis* เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกบริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของเอ็กโซ-พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียอะซิติกตรึงไนโตรเจน *N. vanlangensis* AR-R3 ทั้งนี้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยาการแพทย์ หรือการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียอะซิติก *N. vanlangensis* AR-R3 เป็นแบคทีเรียที่ได้มาจากการแยกเชื้อจากรากของต้นข้าว มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และมีประสิทธิภาพในการละลายธาตุฟอสฟอรัสและสังกะสี [17] และผลการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรีย *N. vanlangensis*

2. กล้าเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียอะซิติก *N. vanlangensis* AR-R3 ที่เก็บรักษาอยู่ในตู้แช่เยือกแข็ง (Deep Freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมาปลูกเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Glucose-Yeast Extract-Peptone (GYP) (2% Glucose, 1% Peptone, 0.5% Yest Extract) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปขีด (Cross Streak) เชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง GYP บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว และใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3. การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

เชื้อบริสุทธิ์จากการทดลองในข้อ 2. จำนวน 1 ลูป นำมาปลูกเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบให้อากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง McFarland ให้มีความขุ่นของเชื้อ 1 McFarland Standard ซึ่งจะมีปริมาณแบคทีเรีย 3×10^8 CFUต่อมิลลิลิตร แล้วนำเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว GYP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปลูกถ่ายเชื้ออีกครั้งลงในอาหารเหลว GYP ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 5,000 มิลลิลิตร โดยในทุก

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

ขั้นตอนของการเลี้ยงเชื้อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการเก็บเกี่ยวส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture Supernatant) โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน [18] และคาร์โบไฮเดรตโดยรวม [19] ของตัวอย่างส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเก็บตัวอย่างไว้ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4. การทำบริสุทธิ์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

การทำบริสุทธิ์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *N. vanlangensis* AR-R3 โดยดัดแปลงวิธีการของ Moonmangmee และคณะ [8] ตามลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 การทำให้เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้น

การทำให้เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้นขึ้น โดยนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองข้อ 3. มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporation ภายใต้สภาวะความดันต่ำ 46 มิลลิบาร์ ความเร็ว 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปริมาตรของตัวอย่างลดลง 10 เท่า (เข้มข้น 10x)

4.2 การตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล

ตัวอย่างส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจากการทดลองข้อที่ 4.1 นำมาตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอทานอลไร้น้ำ (Absolute Ethanol) ในอัตราของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ส่วน ต่อ สารละลายเอทานอลไร้น้ำ 3 ส่วน (โดยปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวตะกอนของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้ง ทำการเก็บรวบรวมตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้าด้วยกัน โดยการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นในปริมาณน้อย ๆ และตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน [18] และคาร์โบไฮเดรตโดยรวม [19] ของตัวอย่างสารละลายเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้น (Crude EPS)

4.3 การแยกเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

4.3.1 Ion-Exchange Chromatography

การแยกเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-Sephacel โดยนำเจล DEAE-Sephacel ที่เก็บรักษาสภาพเจลไว้ในสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเจลด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปในปริมาณมาก ๆ คนให้ เจลกระจายตัวแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เจลตกตะกอน เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเจลซ้ำตามวิธีการข้างต้นจนเจลมีสภาพเป็นกลาง (pH 7) จากนั้นปรับสภาพเจลด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นปริมาณมาก ๆ เช่นเดียวกับการล้างด่างข้างต้นจนเจลมีสภาพเป็นกลาง (pH 7) จากนั้นทำการบรรจุเจลลงในคอลัมน์แก้ว (ø1.6x20 cm) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราการไหล (Flow Rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการปรับสภาพ (Equilibrate) เจลในคอลัมน์ด้วยสารละลาย Tris-HCl (pH 8.5) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จนกระทั่งเจลมีค่า pH เท่ากับ 8.5 จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้น (Crude EPS) จากการทดลองข้อที่ 4.2 มาโหลดผ่านคอลัมน์นี้ด้วยอัตราการไหลดังกล่าวข้างต้น ทำการเก็บตัวอย่างจากคอลัมน์ หลอดละ 5 มิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการโหลดตัวอย่าง จากนั้นทำการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมในปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แล้วจึงทำการชะล้างตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นนำตัวอย่างในแต่ละหลอดมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

240, 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยรวมด้วยวิธี Phenol Sulfuric Acid [19] แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ตามลำดับ ทำการรวบรวมหลอดตัวอย่างที่มีเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้าด้วยกันของแต่ละพีค จากนั้นทำการตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละพีค ตามวิธีการในข้อ 4.1 เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

4.3.2 Sephacryl™ Column Chromatography เจลชนิด Sephacryl™ S-400 Resolution (Amersham Biosciences) ที่เก็บรักษาสภาพเจลไว้ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 20% นำมาเทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่น คนให้เจลกระจายตัวแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เจลตกตะกอน เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำการล้าง เจลตามวิธีการข้างต้น 2-3 ครั้ง จากนั้นทำการบรรจุเจลลงคอลัมน์ XK (i.d. 16 mm: XK 16/100) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของ Sephacryl™ GE Healthcare Bio-Sciences AB และทำการปรับสภาพเจลในคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้อัตราการไหล 22 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.3 การโหลดตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้นลงในคอลัมน์

สารละลายเข้มข้นของ EPS PI ของพีค (Peak) ที่ 1 จากการทดลองข้อที่ 4.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาโหลดผ่านคอลัมน์ Sephacryl™ S-400 Column Chromatography (4.3.2) ด้วยอัตราการไหล 22 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นทำการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยเก็บตัวอย่างหลอดละ 2.2 มิลลิลิตร ติดตามโพรไฟล์ของคอลัมน์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 240, 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยรวมในทุกหลอดด้วยวิธี Phenol Sulfuric Acid [19] แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการเก็บรวบรวมหลอดตัวอย่างที่มีเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้าด้วยกัน และตกตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลไร้น้ำ ตามวิธีการข้อ 4.2 และละลายตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์กลับด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรน้อย ๆ ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน [18] และคาร์โบไฮเดรตโดยรวม [19] ของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ และเก็บตัวอย่างไว้ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5. การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC)

การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี TLC ทำโดยนำสารละลายตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 4.3.3 มาทำการไฮโดรไลซ์ในสภาวะที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 นอร์มัล (โดยปริมาตร) ในหลอดแก้วฝาเกลียว นำไปบ่มในเครื่องให้ความร้อน (Heat Block) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยกรด (Co-Evaporator) ออก 3-4 ครั้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Speed Vacuum Concentrator) จนเป็นกลางแล้วตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี TLC (Silica Gel 60, Merck Co., Germany) ใช้สารละลายอิ่มตัวของ n-propanol: น้ำ (85:15 โดยปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยการสเปรย์สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5% ในเอทานอล นำแผ่น TLC ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6. การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของตัวอย่าง EPS บริสุทธิ์ทำโดยวิธี HPLC ด้วยเครื่อง Water Alliance e2695 Separations Module (Water Corporation 2013, USA) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวชะ (Mobile Phase) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

ต่อนาที และตรวจจับสัญญาณด้วย Refractive Index Detector (RI) โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส และแมนโนสมาตรฐาน โดยใช้สภาวะของเครื่องในการตรวจวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะในการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยวิธี HPLC

Parameter	Optimized condition
Chromatograph:	HPLC Waters e2695
Column:	Shodex SUGAR SP0810, Column Size (mm): I.D. x Length, 8.0 x 300
Eluent:	H_2O
Flow rate:	0.6 mL/min
Detector:	Refractive Index (RI)
Detector temp.:	40°C
Column temp.:	80°C
Injection volume:	10 μl

7. การตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกบริสุทธิ์จากการทดลองข้อที่ 4.3.3 นำสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel Permeation Chromatography ด้วยเครื่อง Water Alliance e2695 Separations Module (Water Corporation 2013, USA) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวชะ (Mobile Phase) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจจับสัญญาณด้วย Refractive Index Detector (RI) โดยเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับ Shodex® STANDARD (Pullulan) Type P-82 น้ำหนักโมเลกุล (Mw) ดังนี้ 7.360 x 10^5 (P-800), 3.480 x 10^5 (P-400), 2.000 x 10^4 (P-200), 10.7x10^4 (P-100), 4.71x10^4 (P-50), 2.11x10^4, (P-20), 0.96x10^4 (P-10) และ 0.61x10^4 (P-5) ดาลตัน (Da) (Showa Denko K.K., Japan) โดยใช้สภาวะของเครื่องในการตรวจวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะในการตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี HPLC

Parameter	Optimized condition
Chromatograph:	HPLC Waters e2695
Column:	Ultrahydrogel™ 2000, Column Size (mm): I.D. x Length, 7.8 x 300
Eluent:	H_2O
Flow rate:	0.6 mL/min
Detector:	Refractive Index (RI)
Detector temp.:	40°C
Column temp.:	80°C
Injection volume:	10 μl

8. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Lowry's method [18] ใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol Sulfuric Acid [19] ใช้กลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

10. การหาค่าจำเพาะของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Specific value)

การหาค่าจำเพาะของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นค่าที่บ่งบอกความบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ หาค่าได้โดยการนำค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหารด้วยปริมาณโปรตีนทั้งหมด ดังสมการ

$$\text{Specific value } (\mu\text{mol/mg}) = \frac{\text{Total Sugar } (\mu\text{mol})}{\text{Total Protein (mg)}} \quad (1)$$

Journal of Applied Research on Science and Technology (JARST), Vol 21, Issue 2, 2022
ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

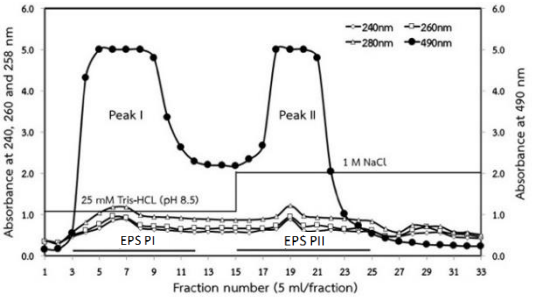
ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. ผลการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

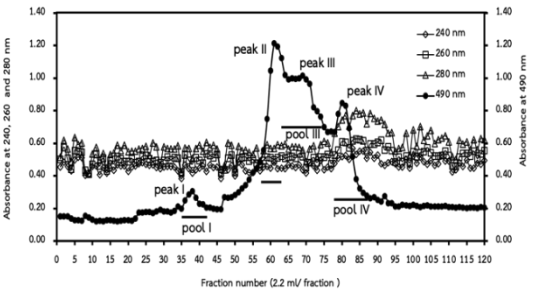
แบคทีเรียอะซิติกตรึงไนโตรเจน *N. vanlangensis* AR-R3 นำมาทดสอบคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยอาหาร 3 ชนิด คือ Nitrogen Free Medium ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน, Glucose-Yeast Extract- Peptone, Glycerol-Yeast Extract-Peptone หลังจากการตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลไร้น้ำ พบตะกอนของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร Glucose-Yeast Extract-Peptone มากที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกอาหาร Glucose-Yeast Extract-Peptone (GYP) สำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป และจากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *N. vanlangensis* AR-R3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ได้ผลผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยรวมเท่ากับ 8.769 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* MTCC 4042^{T} ที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน [10]

2. ผลการแยกบริสุทธิ์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี Ion-Exchange Chromatography

จากการนำเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้น (Crude EPS) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-Sephacel จากการทดลองพบพีคของพอลิแซ็กคาไรด์จำนวน 2 พีค คือ EPS PI (Peak I) ซึ่งเป็นพีคหลัก พบอยู่ในช่วงหลอดที่ 3 ถึง 12 ซึ่งเป็นพีคของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ยึดเกาะกับเจล และ EPS PII (Peak II) เป็นพีครองโดยจะพบพีคที่ 2 อยู่ในช่วงหลอด ที่ 15 ถึง 25 (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นตัวอย่างหลังการชะล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แสดงว่าเป็นพีคของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ยึดเกาะกับเจล จากนั้นทำการเก็บรวมหลอดตัวอย่างของพีค EPS PI และพีค EPS PII ได้ปริมาณผลผลิตโดยรวมของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 3,415 และ 510 ไมโครโมล คิดเป็นการได้กลับคืน (Recovery) 71.1% และ 10.6% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 โพรไฟล์การแยกบริสุทธิ์ Crude EPS ด้วย DEAE-Sephacel Column Chromatography



รูปที่ 2 โพรไฟล์การแยกบริสุทธิ์ EPS PI ด้วย Sephacryl^{TM} S-400 Column Chromatography

3. ผลการทำบริสุทธิ์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Gel Filtration Chromatography

จากการนำตัวอย่าง EPS PI ซึ่งเป็นผลผลิตหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ชนิด DEAE-Sephacel มาทำการแยกบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการผ่านคอลัมน์ชนิด Sephacryl^{TM} S-400 ผลการทดลองพบโพรไฟล์ของพอลิแซ็กคาไรด์จำนวน 4 พีค ด้วยกันคือ Peak I รวบรวมจากหลอดตัวอย่างที่ 35 ถึง 40 (Pool I), Peak II รวบรวมจากหลอดตัวอย่างที่ 55 ถึง 64 (Pool II), Peak III รวบรวมจากหลอดตัวอย่างที่ 64 ถึง 75 (Pool III) และ Peak IV รวบรวมจากหลอดตัวอย่างที่ 77 ถึง 86 (Pool IV) ตามลำดับ (รูปที่ 2) ทำการรวมหลอดตัวอย่างในแต่ละพีคได้ปริมาณผลผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

กลับมาโดยรวมเท่ากับ 80 (1.67% Recovery), 1,128 (25.6% Recovery), 1,587 (33.0% Recovery), และ 28.6 (0.59% Recovery) ไมโครโมล ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จะเห็นได้ว่าเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ชนิด Sephacryl™ S-400 ใน Pool I, Pool II และ Pool III มีค่าจำเพาะที่มากกว่า Crude EPS ที่ยังไม่ได้ผ่านคอลัมน์ถึง 30 เท่า แสดงว่าเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านทั้งสองคอลัมน์แล้วมีความบริสุทธิ์มากขึ้น เนื่องจากขั้นตอนการผ่านในแต่ละคอลัมน์สามารถกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนออกจากตัวอย่างทำให้เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

ตารางที่ 3 การแยกบริสุทธิ์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียอะซิติก *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3

Step of purification	Total Protein (mg)	Total Sugar (μmol)	Specific value (μmol/mg)	Recovery (%)
Crude EPS	1,237	4,801	3.880	100
DEAE-Sephacel				
EPS PI (Peak I)	832	3,415	4.105	71.1*
EPS PII (Peak II)	373	510	1.37	10.6
Sephacryl™ S-400				
Pool I (peak I)	ND**	80.0	∞	1.67
Pool II (peak II)	9.62	1,228	128	25.6
Pool III (peak III)	10.8	1,587	146	33.0
Pool IV (peak IV)	2.98	28.6	1.73	0.59

*EPS PI ที่ผ่าน DEAE-Sephacel แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephacryl™ S-400

**ND: Not detected

ตารางที่ 4 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC)

ลำดับที่	Sample name	Retention time (min)	Mw (เฉลี่ย) (Da)
1	EPS Pool I (Peak I)	6.367	2.180×10^8
2	EPS Pool II (Peak II)	11.607	5.638×10^6
3	Std. P-800	14.544	7.360×10^5
4	EPS Pool III (Peak III)	14.938	5.523×10^5
5	Std. P-400	15.563	3.480×10^5
6	EPS Pool IV (Peak IV)	16.402	1.990×10^5
7	Std. P-200	16.415	2.000×10^4

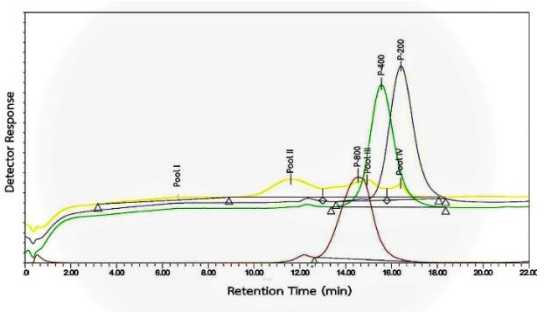
4. ผลการตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

เมื่อนำเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์จากคอลัมน์ชนิด Sephacryl™ S-400 ทั้ง 4 พีค คือ Pool I, Pool II, Pool III และ Pool IV มาตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography โดยใช้ Shodex® STANDARD (Pullulan) Type P-82 จำนวน 3 ขนาด ได้แก่ P-800, P-400 และ P-200 เป็นน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน พบว่าแต่ละพีคมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 2.180×10^8, 5.638×10^6, 5.523×10^5 และ 1.990×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ (รูปที่ 3, ตารางที่ 4) จากผลการทดลอง Pool I และ Pool II มีค่า Retention time เท่ากับ 6.367 และ 11.607 นาที เมื่อนำมาวิเคราะห์

Journal of Applied Research on Science and Technology (JARST), Vol 21, Issue 2, 2022
ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

น้ำหนักโมเลกุลเทียบกับสารมาตรฐาน Pullulan พบว่าใน Pool I และ Pool II มีค่า Retention time น้อยกว่า P-800 แสดงว่าเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ใน Pool I และ Pool II มีขนาดใหญ่กว่า P-800 ทำให้ค่าที่วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลได้นั้นเป็นค่าที่ประมาณ ดังนั้นจึงต้องมีการเลือกใช้สารมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า P-800 นำมาวิเคราะห์จึงจะได้ค่าที่แม่นยำมากขึ้น

5. ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี TLC



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์จาก *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3 ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography

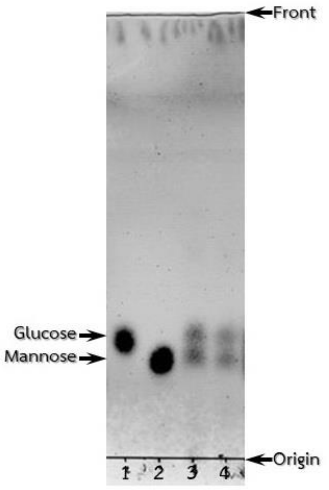
5. ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี TLC

จากการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ของแบคทีเรียอะซิติก *N. vanlangensis* AR-R3 ที่ผ่านคอลัมน์ชนิด Sephacryl™ S-400 จำนวน 4 พีค คือ Pool I, Pool II, Pool III และ Pool IV โดยวิธี TLC พบว่าเอ็กโซ-พอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 พีค เป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหมือนกันจำนวน 2 ชนิด คือ กลูโคส และแมนโนส (รูปที่ 4) และทำการยืนยันผลการทดลองข้างต้นด้วยวิธี High-performance anion-exchange chromatography (HPLC) พบว่าองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ของทั้ง 4 พีค ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี TLC ซึ่งผลการศึกษาวิจัยนี้มีผลการทดลองแตกต่างไปจากการรายงานองค์ประกอบของฮอโมพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดลีแวนของ *N. vanlangensis* TN01LGI^{T} และ VTH-AC01 ที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดี่ยว คือ ซูโครส [11] สำหรับแบคทีเรีย *A. bogorensis* NRIC 0311^{T} ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส และแรมโนส และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 100 กิโลดาลตัน [8] เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. bogorensis* ด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถผลิตฮอโมพอลิแซ็กคไรด์ (Homopolysaccharide) ชนิดฟรุกแทน (Fructan) ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวคือ ฟรุกโตส [9] *Acetobacter* มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 4 ชนิด กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และกรดกลูโคโรนิก ในอัตราส่วนโมลาร์โดยประมาณ 6:2:1:1 [20] *Acetobacter* sp. SKU 1100 สามารถผลิตพอลิแซ็กคา-ไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และแรมโนส และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 120 กิโลดาลตัน [6] เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Kozakia baliensis* มีองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ กลูโคส และกาแลคโตส มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 700 กิโลดาลตัน [21] ในแบคทีเรียอะซิติกสกุล *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524 ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเซลลูโลส ซึ่งจัดเป็นฮอโมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเพียงน้ำตาชนิดเดียว [22] นอกจากนี้ยังพบการรายงานการใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *G. diazotrophicus* Pal5 ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และอาศัยอยู่ในรากพืช (Endophyte) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีบทบาทสำคัญในการให้แบคทีเรียนี้เข้าสู่รากพืช [13] โดยเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส [23] จากผลการศึกษาวิจัยจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ [8, 9, 11, 23]

ดังนั้นในการศึกษาการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *N. vanlangensis* AR-R3 ในงานวิจัยนี้ด้วยอาหารเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส พบว่าแบคทีเรียผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ เนื่องจากมีองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และขนาดของโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างจากแบคทีเรียอะซิติกสกุลอื่นดังกล่าวข้างต้นโดยเฉพาะกับ *N. vanlangensis* TN01LGI^{T} และ VTH-AC01 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุลเดียวกัน [6, 8, 9, 11, 20, 21, 22, 23]



รูปที่ 4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียอะซิติก *Nguyenibacter vanlangensis* AR-R3 ด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาตรฐาน
เลนที่ 1: สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน
เลนที่ 2: สารละลายน้ำตาลแมนโนสมาตรฐาน
เลนที่ 3: Pool II
เลนที่ 4: Pool III

สรุปผล

แบคทีเรียอะซิติกตรึงไนโตรเจน *N. vanlangensis* AR-R3 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากการแยกบริสุทธิ์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 4 ขนาด ที่มีองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหมือนกันคือกลูโคสและแมนโนส และพบว่าเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่แตกต่างจากแบคทีเรียสกุลเดียวกันเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์จากแบคทีเรียอะซิติกสามารถนำมาศึกษาคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ และนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอาง หรือวัสดุทางการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแหล่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์การทดลอง และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และอำนวยความสะดวกห้องปฏิบัติการวิจัยที่ใช้ในการศึกษาและการทดลองจนทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. Sievers M, Ludwig W, Teuber M. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilum* species as a branch of acidophilic bacteria in the **α**- subclass of Proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. System Appl Microbiol. 1994;17: 189–96.
2. Trceck J, Barja F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the

1 6 S–2 3 S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. INT J Food Microbiol. 2015;96:137–44.

3. Pedraza RO. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. INT J Food Microbiol. 2008;125:25-35.

4. Samaddar N, Paul A, Chakravorty S, Chakraborty W, Mukherjee J, Chowdhuri D, et al. Nitrogen fixation in *Asaia* sp. (family Acetobacteraceae). Curr Microbiol. 2011;63:226–31.

5. Janczarek M, Rachwal K, Ciesla J, Ginalska G, Bieganowski A. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. Plant Soil. 2015;388:211–27.

6. Deeraksa A, Moonmangmee S, Toyama H, Yamada M, Adachi O, Matsushita K. Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, *pol*E, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100. Microbiol. 2005;151:4111–20.

7. Samaddar N, Paul A, Chakravorty S, Chakraborty W, Mukherjee J, Chowdhuri D, et al. Nitrogen fixation in *Asaia* sp. (family Acetobacteraceae). Curr Microbiol. 2011;63: 226-31.

8. Moonmangmee S, Kawabata K, Toyama H, Adachi O, Matsushita K. A novel extracellular polysaccharide from acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis* NRIC 0311^{T}. Biosci Bioeng. 2002;93:192-200.

9. Kato N, Mizuno M, Nakai Y, Nozaki K, Suga H, Kanda T, et al. Structure analysis of the water-soluble carbohydrate from *Asaia bogorensis* by NMR spectroscopy. J Appl Glycosci. 2007;54:231-33.

10. Janczarek M, Rachwal K, Ciesla J, Ginalska G, Bieganowski A. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and Its role in bacterial attachment and surface properties. Plant Soil. 2015;388:211-27.

11. Vu HTL, Yukphan P, Chaipitakchonlatarn W, Malimas T, Muramatsu Y, Bui UTT, et al. *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α-Proteobacteria. J Gen Appl Microbiol. 2013;59:153-66.

12. Vu HTL, Bui UTT, Yukphan P, Malimas S, Kieu NP, Muramatsu Y, et al. The traits of the plant growth promoting acetic acid bacterium, *Nguyenibacter vanlangensis*. Vietnam J Sci Technol. 2019;57:439-48.

13. Meneses C, Gonçalves T, Alquéres S, Rouws L, Serrato R, Vidal M, et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. Plant Soil. 2017;416:133-47.

14. Chawla PR, Bajaj IB, Survase, SA, Singhal RS. Microbial cellulose: fermentative production and applications. Food Technol Biotechnol. 2009;47:107–24.

15. Okiyama A, Motoki M, Yamanaka S. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

cellulose for food materials. Food Hydrocolloids. 1992;6:479-87.

16. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose the natural power to heal wounds. Biomaterials. 2006;27:145-51.
17. Ubonrat J, Moonmangmee S, Khunajakr N, Moonmangmee D. Isolation and screening of plant growth promoting bacteria (PGPB) from rice (*Oryza sativa*) and rhizosphere soil. Sci Tech RMUTT J. 2018;8:190-204.
18. Dully JR, Grieve PA. A simple technique for eliminating interference by detergents in the lowry's method of protein determination. Anal Biochem. 1975;64:136-41.
19. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reber PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal Chem. 1956;28:350-56.
20. Minakami H, Entani E, Tayama K, Fujiyama S, Masai H. Isolation and characterization of a new polysaccharide-producing *Acetobacter* sp. Agric Biol Chem. 1984;48:2405-14.
21. Moonmangmee S, Moonmangmee D, Adachi O, Toyama H. Novel exopolysaccharide from *Kozakia baliensis*. The 2nd International Conference on Acetic Acid Bacteria, November 11-14, Nagoya University, Nagoya, Japan. 2008. p. 100.
22. Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. J Appl Microbiol 2009;107:576–83.
23. Serrato RV, Meneses CHSG, Vidal MS, Santana-Filho AP, Iacomini M, Sassaki GL, et al. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. Carbohydr Polymer. 2013;98:1153–59.