บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างถั่วเน่าในแหล่งต่างๆ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียทนร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้จำนวน 108 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นกรัมบวก รูปแท่ง มีสปอร์ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ *Bacillus* ซึ่งมีรายงานของ Goto *et al.*, 1992, Hara *et al.*, 1982, Kubota *et al.*, 1993 พบว่า *Bacillus* หลายสปีชีส์ เช่น *B. subtilis*, *B.licheniformis*, *B. megaterium* สามารถผลิต PGA ได้ (Nagai และ Itoh, 1997) นอกจากนี้ Shiroki, 1999 ได้รายงานว่าในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น (natto) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับถั่วเน่าของไทย แต่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* (natto) เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิต มี PGA เป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังนั้นในถั่วเหลืองหมักของไทย (ถั่วเน่า) เชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการหมัก คือ เชื้อในจีนัส *Bacillus* ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ตรวจพบอาจเกิดการปนเปื้อนในกรรมวิธีการหมักซึ่งเป็นการปนเปื้อนหลังจากการต้มถั่ว (post-heating contaminate) (ภาณุวรรณ, 2538)

เมื่อทดสอบการผลิต PGA โดยเลี้ยงใน PGA producing medium ที่มีกลูโคส 2% และแอมโมเนียมซัลเฟต1% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรีย 96 ไอโซเลท สามารถผลิต PGA ได้ หลังจากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PGA ได้สูงมา 12 ไอโซเลทเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิต PGA อีกครั้งหลังจากที่เก็บเป็น stock culture ใน NA slant ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไอโซเลท RS-2 เพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่ยังคงผลิต PGA ได้ในปริมาณที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ส่วนไอโซเลทอื่นๆผลิต PGA ได้ลดลงซึ่งอาจเนื่องมาจากการ subculture หลายๆครั้งรวมทั้งใน nutrient agarไม่มีส่วนประกอบของถั่วเน่าซึ่งเป็นแหล่งที่ทำการแยกเชื้ออยู่ในอาหารอาจทำให้สารอาหารไม่เพียงพอจึงทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปได้ แบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุด 6.25 mg/ml และเมื่อสังเกตน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท RS-2 มีลักษณะข้นและหนืดมากซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ PGA แสดงว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อมีปริมาณ PGA อยู่มาก และเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการตามหนังสือ Burgey's Manual of Systematic Bacteriology 8thed และ เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่องการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ พบว่าเป็น *Bacillus subtilis*

เมื่อศึกษาระยะเวลาในการผลิต PGA ควบคู่ไปกับการวัดการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* RS-2 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงเชื้อจะเริ่มการผลิต PGA แต่มีปริมาณเพียง 0.425 mg/ml เท่านั้น และปริมาณ PGA จะมากขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีการผลิตสูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง เท่ากับ 6.25 mg/ml หลังจากนั้นปริมาณการผลิต PGA จะค่อยๆลดลง ส่วนการเจริญจะเห็นได้ว่าเชื้อจะเจริญมากที่สุดที่เวลา 15 ชั่วโมงโดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ $8.5x10^9$ cfu/ml หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีเซลล์เจริญเลยที่ความเข้มข้น 10^{-4} ซึ่งอาจเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรดเพิ่มมากขึ้นเพราะปริมาณ PGA เพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญในสภาพความเป็นกรดนี้ได้

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของ *B. subtilis* RS-2 คือที่ 45 องศาเซลเซียส จากขั้นตอนการแยกเชื้อได้ทำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ชัดว่าเมื่อทำการบ่มไว้เพียง 12 ชั่วโมงก็สามารถเห็นการเจริญได้อย่างชัดเจน แต่เมื่อทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะเห็นว่าโคโลนีมีขนาดเล็กกว่าบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เนื่องจาก *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่มี สปอร์ดังนั้นจึงเป็นคุณสมบัติอีกข้อหนึ่งที่ทำให้สามารถเจริญได้ดีในที่มีอุณหภูมิสูงได้ แต่เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการผลิต PGA เลย ซึ่งเป็นเพราะเชื้อไม่สามารถทนอุณหภูมิสูงขนาดนี้ได้จึงไม่มีการเจริญและการผลิต PGA ส่วนอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสนั้นมีการผลิต PGA ได้ค่อนข้างน้อย โดยจะพบว่าอุณหภูมิยิ่งต่ำลงการผลิต PGA จะลดต่ำลงตามไปด้วย

pH ก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิต PGA โดยจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ การผลิต PGA น้ำหนักโมเลกุล และ stereochemistry ของพอลิเมอร์ที่เชื้อผลิต จากการทดลองเชื้อ *B. subtilis* RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดเมื่อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Cromwick และคณะ, 1996 ที่พบว่า เชื้อ *B. licheniformis* สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดที่ pH 6.5 เช่นกัน แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้นจนถึง 9.0 หรือลดลงจนถึง 4.5 ซึ่งเป็น pH ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างสูง พบว่าการผลิต PGA จะลดลงมากจนกระทั่งไม่สามารถผลิต PGA ได้เลย ซึ่งเนื่องมาจากเซลล์ตายเพราะไม่สามารถทน pH ในระดับนี้ได้ (Ko และ Gross, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า pH ระหว่าง 5.0-8.5 *B. subtilis* RS-2 สามารถผลิต PGA ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นข้อดีของเชื้อเนื่องจากสามารถเจริญและผลิต PGA ได้ในช่วง pH ที่กว้าง

ผลของแหล่งคาร์บอนนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญและการผลิต PGA จากการทดลองพบว่า *B. subtilis* RS-2 สามารถเจริญและผลิต PGA ได้มากเมื่อไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอนอื่นๆลงในอาหาร ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารพื้นฐานมี sodium L-glutamate ซึ่งมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่แล้วเพียงพอต่อความต้องการของ *B. subtilis* RS-2 ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่เติมลงในอาหารเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุกโตส ซอร์โบส แลกโตส และซูโครส พบว่า

ทำให้ปริมาณการผลิต PGA ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการนำไปใช้ของเชื้อสามารถทำได้ยากกว่า sodium L-glutamate และผลผลิตที่เกิดขึ้นจะเป็นสาร polysaccharide ตัวอื่นเกิดขึ้นมาแทน PGA

ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และปริมาณการผลิต PGA จากการทดลองพบว่า *B. subtilis* RS-2 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น เปปโตน ยีสต์เอกแทรกซ์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต แต่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตได้ดีที่สุด ส่วนปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA คือ 1% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Goto และ Kunioka, (1992) โดยพบว่าเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในอาหารจะทำให้เชื้อผลิต PGA ได้สูงสุดและไม่เกิด by product ขึ้น แต่เมื่อเติมปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยลง 0-0.25% จะทำให้ α-ketoglutaric acid สร้าง glutamic acid เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเนื่องจากในเซลล์มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ ดังนั้นความเข้มข้นของ glutamic acid ในเซลล์ก็จะต่ำตามไปด้วยทำให้การสร้าง PGA ได้น้อยลง แต่ถ้าเติมแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่า 1% จะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงและทำให้การผลิต PGA ลดลงตามไปด้วยเช่นกัน

ปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งในกระบวนการทางชีวเคมีสำหรับการผลิต PGA จากการทดลองผลของอัตราการให้อากาศสำหรับการผลิต PGA ของ *B. subtilis* RS-2 พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้นตั้งแต่ 120 รอบต่อนาทีไปจนถึง 200 รอบต่อนาที *B. subtilis* RS-2 สามารถผลิต PGA ได้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 8.25 mg/ml เมื่อให้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเชื้อเริ่มผลิต PGA จะปล่อยสารนี้ออกมานอกเซลล์จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อข้นและหนืด เมื่อเชื้อผลิต PGA ออกมามากก็จะยิ่งทำให้อาหารมีความหนืดมากขึ้น ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนย้ายออกซิเจนเป็นไปได้อย่างลำบากและไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงและการผลิต PGA ก็จะลดลงตามไปด้วย เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้นจนเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ เชื้อก็จะผลิต PGA ได้เพิ่มมากขึ้น (Cromwick และคณะ,1996) จากการทดลองครั้งนี้ได้ให้อัตราการให้อากาศสูงสุดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นค่าสูงสุดที่เครื่อง incubator shaker สามารถทำงานได้ จึงทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าถ้าเพิ่มอัตราการให้อากาศมากกว่านี้ปริมาณการผลิตจะเพิ่มขึ้นอีกหรือไม่ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงควรพัฒนาในด้านการให้อากาศเพื่อการเพิ่มผลผลิต PGA ให้สูงยิ่งขึ้น

ความเข้มข้นของ sodium L-glutamate มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิต PGA เป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการผลิต PGA รวมทั้งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญของเซลล์ จากการทดลองผลของความเข้มข้นของ sodium L-glutamate ต่อการผลิต PGA ของ *B. subtilis* RS-2 พบว่าเมื่อไม่เติม sodium L-glutamate ในอาหาร *B. subtilis* RS-2 จะไม่

สามารถผลิต PGA เลย เนื่องจากเชื้อไม่สามารถผลิต PGA ได้เมื่อในอาหารไม่มีสสารตั้งต้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium L-glutamate ขึ้น เชื้อจะผลิต PGA ได้มากขึ้นเรื่อยๆและผลิตได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 6% แต่เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 8% ปริมาณการผลิต PGA จะเริ่มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kubota และคณะ (1993)ที่พบว่าความเข้มข้นที่ 7% *B. subtilis* F-2-01 จะผลิต PGA ได้สูงสุด เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นกว่านี้ปริมาณการผลิต PGA จะลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University