จินตนา ต๊ะย่วน : การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและผลของสารต่อระบบภูมิคุ้มกัน (PRODUCTION OF LACTIC ACID BACTERIUM EXOPOLYSACCHARIDES AND THEIR IMPACT ON THE IMMUNE SYSTEM) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 186 หน้า.

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ทั้งชนิดเดี่ยวและต่างชนิดกันที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนอกเซลล์ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดเป็นที่สนใจใช้เป็นสารทำให้เกิดความคงตัวของอาหาร จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้จากแหล่งที่พบเชื้อตามธรรมชาติจำนวน 566 ไอโซเลท พบว่าร้อยละ 10 และ 19 สร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเมือกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ถึง 0.9 และ 0.2 ถึง 2.1 เซนติเมตร บนอาหารแข็ง พร้อมทั้งผลิตสารได้ในช่วง 0.1 ถึง 0.6 กรัมต่อลิตร และ 0.1 ถึง 6.9 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสและซูโครสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ เมื่อศึกษาเพื่อการระบุชนิดของแบคทีเรียที่สร้างสารพอลิเมอร์ได้ในปริมาณสูงจำนวน 8 ไอโซเลท ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท C56 มีความเหมือนกับ *Lactobacillus salivarius* ร้อยละ 99 และอีก 7 ไอโซเลท ระบุได้เพียงว่าอยู่ในสกุล *Weissella* (PSMS4-4), *Pediococcus* (P14), *Leuconostoc* (PSMS1-5), *Lactobacillus* (FKU23 และ RMS3-1) และ *Streptococcus* (I5 และ G3) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียเหล่านี้แตกต่างกันทั้งชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อ น้ำตาลทรายขาวจากอ้อยจัดได้ว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ให้การผลิตจำเพาะของสารพอลิเมอร์แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียในช่วง 0.03 ถึง 106.94 พิโกกรัมต่อเซลล์ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Streptococcus* sp. I5 ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสและกลูโคสร้อยละ 86.91 และ 13.09 ตามลำดับ เป็นสารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อให้สารปริมาณ 100 ไมโครกรัมแก่หนูปลอดเชื้อจำเพาะทางช่องท้อง สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ของม้ามหนูด้วยดัชนีการกระตุ้นเท่ากับ 13.96 และกระตุ้นการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด IL-10 เท่ากับ 218.49 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อผลิตสารพอลิเมอร์ในถังหมักที่มีอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 ลิตร ใช้น้ำตาลทรายขาวจากอ้อย 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ 6.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ปริมาณสูงสุด 53.45 กรัมต่อลิตร

(อัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นพอลิเมอร์ร้อยละ 42.66) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณสูงกว่าค่าที่มีการรายงานสำหรับเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกถึง 1.7 เท่า จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในเชิงลึกต่อไป เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร

สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

CHINTANA TAYUAN : PRODUCTION OF LACTIC ACID BACTERIUM EXOPOLYSACCHARIDES AND THEIR IMPACT ON THE IMMUNE SYSTEM. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 186 PP.

EXOPOLYSACCHARIDES/LACTIC ACID BACTERIA/IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY/EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION

Exopolysaccharides (EPS) are high molecular mass polymers consisting of monosaccharide residues, and produced by microorganisms. Some of these polysaccharides are of interest to be used as alternative biothickeners in food. A total of 566 strains of lactic acid bacteria isolated from their natural habitats were tested for EPS production using glucose or sucrose as a sole carbon source. Approximately 10 and 19% of lactic acid bacterial strains were able to produce slimy colonies of 0.2-0.9 and 0.2-2.1 cm diameter, and produced EPS ranging from 0.1-0.6 and 0.1-6.9 g equivalent glucose/l when cultivated in MRS medium containing 2% of glucose and sucrose, respectively. Bacterial identification of eight EPS-producing isolates was performed using morphological and physiological characteristics, and 16S rRNA gene sequences. The isolate C56 had 99% similarity to *Lactobacillus salivarius*. Other EPS-producing isolates belonged to the genera *Weissella* (PSMS4-4), *Pediococcus* (P14), *Leuconostoc* (PSMS1-5), *Lactobacillus* (FKU23 and RMS3-1), and *Streptococcus* (I5 and G3). Types and concentrations of carbon sources, the initial pH of the culture medium, and cultivation temperature influenced the production of EPS by each strain. White sugar from sugar cane gave the highest specific EPS production

ranging from 0.03-106.94 pg/cell. Mannose-rich EPS (86.91% mannose and 13.09% glucose) produced by *Streptococcus* sp. I5 stimulated mouse splenocyte proliferation (stimulation index of 13.96) and anti-inflammatory (interleukin-10) cytokine secretion (218.49 pg/ml) after intraperitoneal inoculation of mice with 100 μg of EPS (primary and booster inoculations). *Streptococcus* sp. I5 was used to produce EPS in 5 l MRS broth containing 150 g/l of white sugar from sugar cane as carbon source. Cultivation temperature and pH of the medium were kept constant at 40°C and 6.0, respectively. The maximum yield of EPS (53.45 g/l; % yield = 42.66) was achieved after 30 h of fermentation. This yield was 1.7 times higher than those reported for heteropolysaccharide production in other lactic acid bacteria. The information obtained from this research is of potential use in the food industry and for medical (anti-inflammatory) applications.

School of Microbiology

Academic Year 2008

Student's Signature Chintana T.

Advisor's Signature Suradet Rattanaj

Co-advisor's Signature