รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาศักยภาพของเลแวนที่มีขนาดแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นสารต้านอักเสบที่มีประสิทธิภาพ

The potential of different molecular weights of levan as an effective anti-inflammatory agent

อาจารย์ ดร. พรพรรณ อร่ามแสงเทียนชัย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณกองทุนวิจัยและพัฒนา

ทุนวิจัยมุ่งเป้าหมายที่ ๓ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ ๐๖๒/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาศักยภาพของเลแวนที่มีขนาดแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นสารต้านอักเสบที่มีประสิทธิภาพ

The potential of different molecular weights of levan as an effective anti-inflammatory agent

อาจารย์ ดร. พรพรรณ อร่ามแสงเทียนชัย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัย เงินรายได้ส่วนงาน เงินกองทุนวิจัยและพัฒนา ทุนวิจัยมุ่งเป้าหมายที่ ๓ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ เลขที่สัญญา ๐๑๒/๒๕๖๒

บทคัดย่อ

เลแวนหรือลีแวนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ของฟรุกโทสที่เชื่อมต่อกันผ่านทางด้วยพันธะเบต้า-(2,6) ไกลโคซิดิก เลแวนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมยา อาหารและเครื่องสำอางที่หลากหลาย เนื่องจากคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย ต้านการเกิดเนื้องอก และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันอาจส่งผลให้ฤทธิ์ชีวภาพที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์การต้านอักเสบของเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน ในการทดลองเริ่มจากการหาสภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยใช้สภาวะในการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ได้แก่ สูตรอาหาร ความเข้มข้นของซูโครส อัตราเร็วในการเขย่า (RPM) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถเตรียมเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันสามขนาด ได้แก่ M1 (>$8x10^5$ ดาลตัน) M2 ($1.5x10^4$ ดาลตัน) และ M3 ($5x10^3$ ดาลตัน) ตามลำดับ เมื่อนำเลแวนทั้งสามขนาดโมเลกุลไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี MTT พบว่าเลแวน M1 M2 และ M3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25-250 μg/mL ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ เมื่อนำเลแวนไปทดสอบการต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ได้รับ LPS พบว่าเลแวนทั้งสามขนาดไม่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบผ่านการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในทางตรงข้าม พบว่าเลแวนทั้งสามขนาดสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในระดับที่แตกต่างกันไป โดย M2 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูงสุด รองลงมาคือ M1 และ M3 ตามลำดับ ดังนั้น เลแวนจึงมีแนวโน้มในการช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันส่งผลต่อการกระตุ้นที่เกิดขึ้น องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงการเตรียมเลแวนที่มีขนาดเหมาะสมเพื่อประยุกต์ใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไป

Abstract

Levan is a polymer of fructose molecules linked via beta-2-6 glycosidic bond. This biopolymer has a potential for applying in pharmaceutical, food and cosmetic industries due to its antibacterial, antitumor, and antioxidant properties. However, the previous research revealed that different levan molecular weights (MWs) might exhibit different levels of biological activities. The objective of this study aims to investigate the effect of different molecular weights (MWs) of levan on its anti-inflammatory. Initially, the culturing conditions of *Bacillus subtilis* such as media formulas, sucrose concentrations, and rate of shaking (RPM) were investigated to obtain different MWs of levan. From the results, three different MWs of levan were prepared which were M1 (>$8x10^5$ Da), M2 ($1.5x10^4$ Da), and M3 ($5x10^3$ Da), respectively. Based on MTT assay, these levans at the concentration range of 31.25-250 μg/mL did not exhibit cytotoxicity to RAW264.7 macrophage cells. However, these three different MWs of levan did not show nitric oxide inhibitory effect in LPS-induced RAW264.7 cells. Therefore, no anti-inflammatory activity was observed from all of these levans. On the other hand, the three different MWs of levan stimulate the nitric oxide production suggesting their immunomodulatory effect. The results showed that M2 can stimulate the highest nitric oxide production when compared to M1 and M3, respectively. Different MWs of levan can therefore lead to different levels of immunostimulation effect. Altogether, the results from this study suggest that certain MWs of levan can be potentially used as a natural immune modulator.

สารบัญเรื่อง

หน้า

ปกใน

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อไทย

บทคัดย่ออังกฤษ

สารบัญภาพ

สารบัญตาราง

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย 2

ทฤษฎี สมมติฐาน และ/หรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง 3

วิธีดำเนินการวิจัย 4

ผลการทดลอง 8

อภิปรายผลการทดลอง 32

สรุปผลการทดลอง 35

ข้อเสนอแนะ 35

ผลผลิต 35

เอกสารอ้างอิง 36

ภาคผนวก 38

ประวัตินักวิจัยและคณะโดยย่อ 42

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย 8

2. เปอร์เซ็นต์ซูโครสที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร BSM ที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis* 10

3. เปอร์เซ็นต์ซูโครสที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร BSMY ที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis* 12

4. อัตราเร็วในการเขย่าที่แตกต่างกันที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis* 15

5. การตกตะกอนเลแวนโดยใช้ปริมาตรของเอทานอลในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 18

6. ขนาดโมเลกุลของเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* 22

7. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 23

8. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 24

9. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 25

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 9

2. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSM ที่มีซูโครสแตกต่างกัน 11

3. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มีซูโครสแตกต่างกัน 13

4. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มีซูโครสแตกต่างกัน และผ่านการนำส่วนใสเดิมไปตกตะกอบด้วยเอทานอล ซ้ำรอบที่สอง 14

5. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครส และใช้ความเร็วรอบ (RPM) ในการเขย่าที่แตกต่างกัน 16

6. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครส และใช้ความเร็วรอบ (RPM) ในการเขย่าที่แตกต่างกัน และผ่านการนำส่วนใสเดิมไปตกตะกอนด้วยเอทานอลซ้ำรอบสอง 17

7. เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครส ใช้อัตราการเขย่า 180 RPM และผ่านการนำส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเอทานอล ในอัตราส่วนและ/หรือจำนวนรอบที่แตกต่างกัน 19

8. TLC โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เลแวนแต่ละแฟรกชันที่ได้การแยกด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR 20

9. FT-IR spectrum ของเลแวนที่ได้ผลิตจาก *Bacillus subtilis* 21

10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL 23

ภาพที่ **หน้า**

11. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL 24

12. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL 25

13. เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS ร่วมกับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL 26

14. เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS ร่วมกับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL 27

15. เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS ร่วมกับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL 28

16. เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS หรือเลแวน M1 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL 30

17. เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS หรือเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL 30

18. เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS หรือเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL 31

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เลแวนหรือลีแวน (levan) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโทส สามารถได้พบในแบคทีเรียหลายชนิด ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เลแวนซูเครส โดยมีสารตั้งต้นเป็นน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทราย และถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย (exopolysaccharide) เลแวนจัดเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) ที่มีคุณลักษณะเป็นไบโอฟิล์ม มีความหนืดต่ำแต่มีความแข็งแรงสูง มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นที่ใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิก (Kim et al., 2005) ปัจจุบันได้มีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ชีวภาพที่น่าสนใจของเลแวน เช่น การมีคุณสมบัติพรีไบโอติกส์หรือช่วยการเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบลำไส้ของมนุษย์ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเซลล์มะเร็งบางชนิด ตลอดจนช่วยต้านการอักเสบ ดังนั้น เลแวนจึงมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ เครื่องสำอาง การแพทย์ ตลอดจนอุตสาหกรรม อาหารสัตว์ได้ (Oner et al., 2016; Belghith et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เลแวนที่สังเคราะห์ขึ้นจากแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ หรือแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่แตกต่างกัน อาจมีขนาดโมเลกุล (molecular weight, MW) และ/หรือระดับของกิ่งก้าน (degree of branching) ที่แตกต่างกันไป โดยทั่วไป เลแวนที่พบในธรรมชาติมีขนาดตั้งแต่ 2 ดาลตัน (Da) ไปจนถึง $100x10^6$ ดาลตัน (Srikanth et al., 2015) ทั้งนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าเลแวนที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน สามารถส่งผลต่อสมบัติทางชีวภาพของเลแวนที่ต่างกันออกไป เช่น เลแวนที่ผลิตจาก *Zymomonas mobilis* ที่มีขนาด $5x10^4$ Da มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ดีกว่าเลแวนที่มีขนาดใหญ่ ($3x10^6$ Da) (Byun et al., 2014) อย่างไรก็ตาม Yoo และคณะ (2014) ได้รายงานว่าเลแวนที่มีขนาดระหว่าง $4x10^5$-$7x10^5$ Da มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้ดีกว่าเลแวนที่มีขนาด $4x10^4$ Da อย่างมีนัยสำคัญ (Yoo et al, 2004) และเมื่อไม่นานมานี้ มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเลแวนมีฤทธิ์ช่วยลดการอักเสบในการทดลองแบบ *in vitro* (Srikanth et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ยังไม่ได้มีการศึกษาหรือรายงานที่ชัดเจนถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเลแวนและฤทธิ์ต้านการอักเสบ ส่งผลให้การนำเลแวนไปประยุกต์ใช้ยังไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเลแวนที่สังเคราะห์ขึ้นจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นกับฤทธิ์การต้านอักเสบของเลแวน เพื่อให้ได้องค์ความรู้ของการเลือกใช้เลแวนที่มีขนาดเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารต้านอักเสบอย่างมีประสิทธิภาพ ในโครงการวิจัยประกอบไปด้วยการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียผลิตเลแวนที่มีขนาดแตกต่างกันได้ จากนั้นการนำผลิตภัณฑ์เลแวนที่มีขนาดต่างๆ มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ การยืนยันขนาดและโครงสร้างของเลแวน และการศึกษาความสามารถในการต้านอักเสบของเลแวนที่ขนาดต่างๆ กัน โดยวัดการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย Lipopolysaccharides (LPS) องค์ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การพัฒนาการสังเคราะห์เลแวนที่มีขนาดเหมาะสมเพื่อนำไปใช้เป็นสารลดการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันจาก *Bacillus subtilis*
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอักเสบของเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

ทฤษฎี สมมติฐาน และ/หรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติและประโยชน์ของฟรุกแทนที่สังเคราะห์ขึ้นจากแบคทีเรียได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากฟรุกแทนมีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการ ได้แก่ ความสามารถในการละลายน้ำได้และมีความหนืดต่ำ การเป็นสารให้ความหวานที่ให้แคลอรีต่ำ การกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ การกระตุ้นการดูดซึมแร่ธาตุ ช่วยลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ตลอดจนการกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Bello et al., 2001; Velazquez-Hernandez et al., 2009) ทั้งนี้ เลแวน จัดเป็นฟรุกแทนหรือพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโทสชนิดหนึ่ง ที่สังเคราะห์ขึ้นจากแบคทีเรียโดยอาศัยน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์เลแวนที่สร้างจากแบคทีเรียมีระดับพอลิเมอร์ตั้งแต่ 40 หน่วย ไปจนถึงมากกว่า 100,000 หน่วย (Visnapuu et al., 2015) ขณะที่เลแวนที่พบในพืชจะมีความยาวอยู่ระหว่าง 10-100 หน่วยเท่านั้น (Dogsa et al, 2013) ความแตกต่างของขนาดเลแวนอาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเลแวน เช่น เลแวนจาก *Zymomonas mobilis* ที่มีขนาด $5x10^4$ Da สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร ได้ดีกว่าเลแวนที่มีขนาดใหญ่ ($3x10^6$ Da) (Byun et al., 2014) ในขณะที่ Yoo และคณะ (2014) พบว่าเลแวนขนาดระหว่าง $4x10^5$-$7x10^5$ Da มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้ดีกว่าเลแวนที่มีขนาด $4x10^4$ Da (Yoo et al, 2014) อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาหรือรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงผลของขนาดเลแวนต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบมาก่อน ข้อเสนอโครงการครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของขนาดเลแวนที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการต้านอักเสบของเลแวน ตลอดจนเพื่อศึกษาหาสภาวะในการสังเคราะห์เลแวนขนาดต่างๆ ของแบคทีเรีย องค์ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้ จะเป็นแนวทางในการนำเลแวนที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นไปพัฒนาเป็นสารต้านการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

1. การเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเลแวน
2. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เลแวนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยเทคนิค TLC
3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เลแวนที่มีขนาดต่างๆกัน
4. การแยกเลแวนขนาดต่างๆ ออกจากกัน
5. การระบุขนาดของเลแวนที่แยกได้โดย GPC-HPLC
6. การยืนยันโครงสร้างเลแวนที่ได้ โดย FT-IR และ/หรือ NMR
7. การทดสอบความเป็นพิษของเลแวนที่ขนาดต่างๆกัน ในเซลล์ไลน์ชนิดแมคโครฟาจ โดยวิธี MTT
8. การทดสอบการต้านอักเสบของเลแวนที่ขนาดต่างๆ กัน ในเซลล์ไลน์ชนิดแมคโครฟาจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

1. องค์ความรู้เกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันที่ผลิตขึ้นจาก *Bacillus subtilis*
2. องค์ความรู้เกี่ยวกับขนาดโมเลกุลของเลแวนกับฤทธิ์การต้านอักเสบในเซลล์ไลน์ RAW264.7
3. แนวทางการประยุกต์ใช้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมเพื่อลดการอักเสบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เครื่องสำอาง หรืออาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์แบคทีเรียและการเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TBRC8573 สั่งซื้อจากศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการเลี้ยง *B. subtilis* ทำโดยนำ stock เชื้อไปแยกเป็นโคโลเดี่ยวบนอาหารแข็งชนิด Nutrient Agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อโคโลนีเดี่ยว (single colony) ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว (NB) ที่ประกอบด้วย 5 g/L Peptone, 5 g/L NaCl, 1.5 g/L Meat extract B และ 1.5 g/L Yeast extract ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าต่อเนื่องที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ไปทดสอบหาเลแวนในขั้นตอนต่อไป

สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียในการทดลอง ประกอบด้วย

- NA (NB และ 1.5% Agar)
- NB (5 g/L Peptone, 5 g/L NaCl, 1.5 g/L Meat extract B และ 1.5 g/L Yeast extract)
- BSM (0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L NaH_2PO_4 และ 3 g/L Na_2HPO_4)
- BSMY (0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L K_2HPO_4 และ 2 g/L yeast extract)

2. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ฟรุกแทนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยเทคนิค TLC

นำส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนด้วย 95% ethanol (1:1, v/v) ล้างตะกอนที่ได้ใน 95% เอทานอลซ้ำอีกครั้ง แล้วละลายตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาเลแวนในเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) โดยมี silica gel plates (K5F; Whatman) เป็น stationary phase และมี n-butanol: acetic acid: water (5:4:1, v/v/v) เป็น mobile phase ตรวจหาฟรุกแทนด้วยสารละลาย Urea-HCl (Defonder, 1952)

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้มีการผลิตเลแวนที่ขนาดต่างๆกัน

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อควบคุมแบคทีเรียให้ผลิตเลแวนที่ขนาดต่างๆ กัน โดยใช้สภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรียแตกต่างกัน ดังนี้

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่มี 10% (w/v) ซูโครส

ถ่ายโอนเชื้อ 10% (v/v) ไปเลี้ยงต่อใน NB, BSM, BSMY ที่มี 10% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าต่อเนื่องที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ ขนาด 1 ลิตร ที่มี NB, BSM, BSMY และ 10% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงต่อเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที จนครบเวลา 55 ชั่วโมง

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BSM ที่มีน้ำตาลซูโครสแตกต่างกัน คือ 8%, 10%, 15% และ 25% (w/v)

ถ่ายโอนเชื้อ 10% (v/v) ไปเลี้ยงต่อใน BSM ที่มี 8% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าต่อเนื่องที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนเชื้อ 3% ลงในฟลาสก์ ขนาด 1 ลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ ที่มี BSM และ 8%, 15% และ 25% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ ทำการเลี้ยงต่อเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที จนครบเวลา 55 ชั่วโมง

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BSMY ที่มีน้ำตาลซูโครสแตกต่างกัน คือ 15% และ 25% (w/v)

ถ่ายโอนเชื้อ 10% (v/v) ไปเลี้ยงต่อใน BSMY ที่มี 10% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าต่อเนื่องที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนเชื้อ 3% ลงในฟลาสก์ ขนาด 1 ลิตร ที่มี BSMY และ 15% และ 25% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ทำการเลี้ยงต่อเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที จนครบเวลา 55 ชั่วโมง

3.4 การใช้อัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน

ถ่ายโอนเชื้อ 10% (v/v) ไปเลี้ยงต่อใน BSMY ที่มี 10% (w/v) ซูโครส ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าต่อเนื่องที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนเชื้อ 3% ลงในฟลาสก์ ขนาด 1 ลิตร ที่มี BSMY และ 10% (w/v) ซูโครสปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ ทำการเลี้ยงต่อ โดยเขย่าพร้อมกันที่อัตราเร็วเท่ากับ 100, 180 และ 250 RPM จนครบเวลา 55 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลา นำเชื้อที่ได้จากสภาวะในข้อ 3.1-3.4 มาปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำการตกตะกอนเลแวนด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี ดังนี้

1. **การใช้ 95% เอทานอล ในอัตราส่วนระหว่างส่วนใสต่อเอทานอลเท่ากับ 1:2 หรือ 1:4 เพื่อตกตะกอน จำนวน 1 รอบ**
2. **การใช้ 95% เอทานอล ในอัตราส่วนระหว่างส่วนใสต่อเอทานอลเท่ากับ 1:2 ในการตกตะกอน จำนวน 2 รอบ**

นำตะกอนที่ได้ไปล้างตะกอนด้วย 80% (v/v) เอทานอล (แช่เย็น) โดยใช้ปริมาตร 1.5 เท่าของตะกอนที่มี แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้ไปแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR ต่อไป

4. การแยกเลแวนแต่ละขนาดออกจากกัน

ทำการแยกสารตัวอย่างเลแวนตามขนาดโมเลกุลที่ได้จากแต่ละสภาวะ โดยอาศัยคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR (GE Health care) มี mobile phase เป็น 50 mM NaCl ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บแฟรกชันละ 1.7 มิลลิตร ทั้งหมด 120 แฟรกชัน ด้วยเครื่องเก็บแฟรกชัน ทำการติดตามสารประกอบคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Phenol–Sulfuric assay ตามด้วยเทคนิค TLC และ GPC-HPLC ตามลำดับ

Phenol-Sulfuric assay

ปิเปตน้ำกลั่นและสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการเก็บแฟรกชันลงใน 96-well plate จากนั้นเติม 120 ไมโครลิตรของกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ตามด้วย 30 ไมโครลิตร ของ 5% phenol นำไปบ่มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างค่า A490 และแฟรกชันที่ได้ จากนั้นรวมแฟรกชันที่มีขนาดใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเทคนิค Freeze dry

5. การวิเคราะห์ขนาด (molecular weight) ของเลแวน ที่ได้ ด้วย Gel filtration Column-HPLC

นำเลแวนขนาดต่างๆ ที่ผ่านการแยกในข้อ 4 ไปทำการหาวิเคราะห์ขนาดโมเลกุล ด้วยเทคนิค GPC-HPLC โดยใช้ TSKgel column และมีน้ำกลั่นเป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้ RI-detector ติดตามเลแวนแต่ละขนาด โดยมีสารละลาย pullulan ที่ขนาดแตกต่างกันเป็นสารมาตรฐาน

6. การวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของผลิตภัณฑ์เลแวนที่ได้

นำผลิตภัณฑ์เลแวนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และมีขนาดแตกต่างกัน ไปวิเคราะห์หาโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR

7. การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของเลแวนที่มีขนาดต่างกันในเซลล์ไลน์โดยวิธี MTT

นำผลิตภัณฑ์เลแวนที่มีขนาดแตกต่างกัน ที่ผ่านการยืนยันขนาดและโครงสร้างแล้ว ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทำการหาช่วงความเข้มข้นของเลแวนขนาดต่างๆ โดยใช้ 3 ความเข้มข้น มีวิธีการโดยย่อดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับเลแวนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook et al., 2005) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) x 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละสภาวะการทดลอง

8. การทดสอบการต้านอักเสบของเลแวนที่ขนาดต่างๆ กัน

ทดสอบความสามารถในการต้านอักเสบของเลแวนที่ขนาดต่างๆ กัน โดยวัดการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ โมเดลที่ใช้ศึกษา คือ เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการ

อักเสบโดย LPS ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชั่นไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่ใช้บ่งชี้แอกทิวิตีของเอนไซม์ iNOS ทั้งนี้ สามารถทดสอบหาปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยา Griess มีวิธีการโดยย่อดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเลแวนขนาดต่างๆ กัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อยู่ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 ul ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% N-(1-naphtyl)-ethylenediamine และ 1% sulfanilamide ใน 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 ul จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook et al., 2015) การทดสอบใช้ aminoguanidine ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS เป็นสารควบคุมแบบบวก ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้โดยเปรียบเทียบแบบ two one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

ผลการทดลอง

1. การหาสภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน

ในการทดลองได้นำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มาเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิด Nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงต่อใน Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ subculture ไปเลี้ยงต่อในสภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่

(1) สูตรอาหาร NB, BSM และ BSMY

(2) เปอร์เซ็นต์ซูโครส 8%, 10%, 15% และ 25% (w/v)

(3) อัตราการเขย่า (RPM) 100, 180 และ 250 RPM

(4) การตกตะกอนเลแวนจากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ปริมาตรของ 95% (v/v) เอทานอลที่แตกต่างกัน (1:2 เท่า, 1:2 เท่า ซ้ำสองรอบ และ 1:4 เท่า)

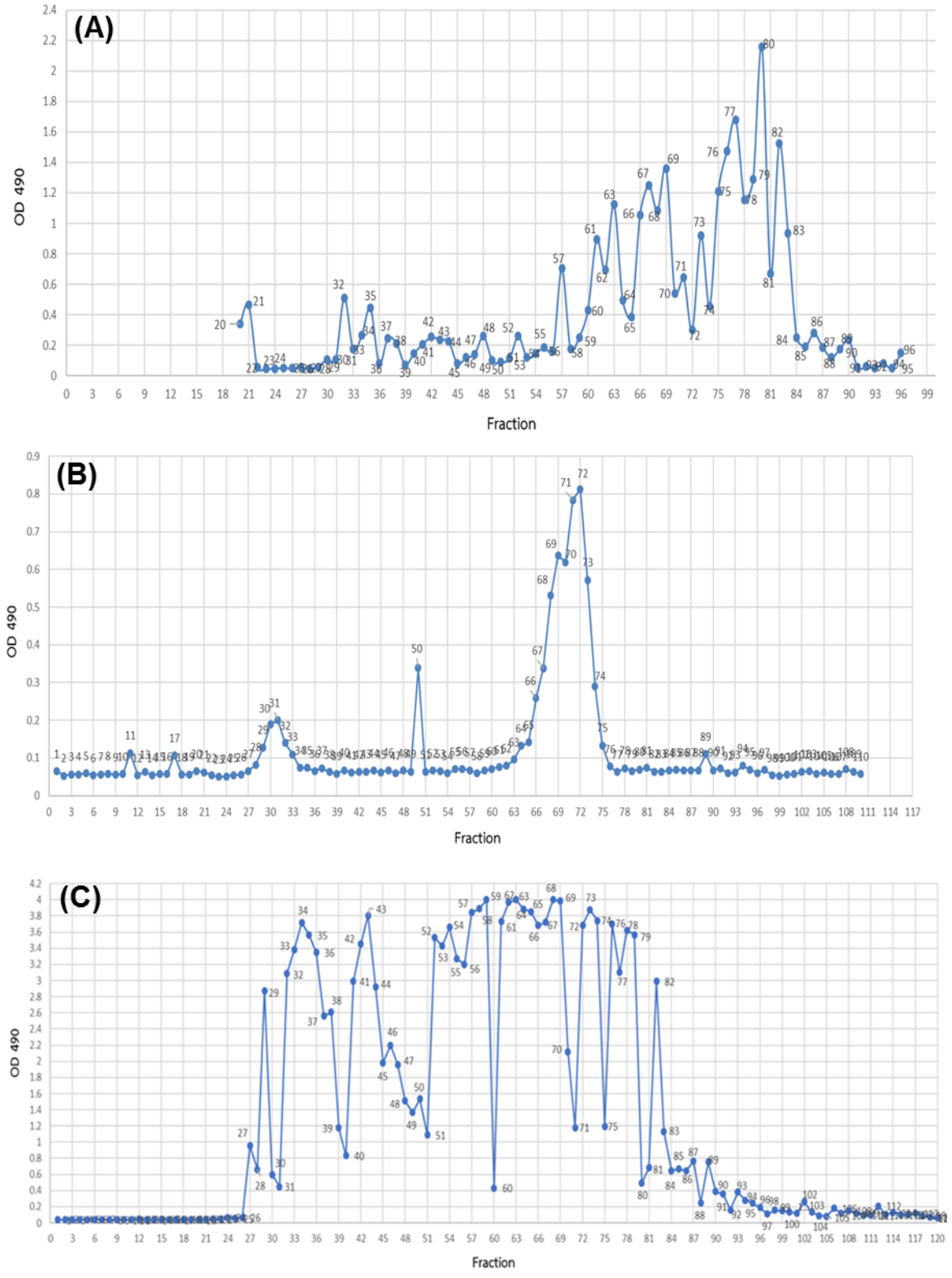
ตะกอนเลแวนที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะที่แตกต่างกันจะถูกนำไปแยกขนาดมวลโมเลกุล (MW) ด้วยคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี Sephacryl S-300 HR (GE) และติดตามแฟรกชันที่มีเลแวนอยู่ด้วย Phenol-sulfuric assay และเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ตามลำดับ

(1) ผลของสูตรอาหารต่อปริมาณและขนาดโมเลกุลของเลแวนที่เกิดขึ้น

จากการใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันในการเลี้ยงแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสูตรอาหาร NB ส่งผลให้เลแวนที่เกิดขึ้นมีปริมาณค่อนข้างน้อยและขนาดโมเลกุลค่อนไปทางขนาดเล็ก (ภาพที่ 1(A)) ในขณะที่สูตรอาหาร BSM ส่งผลให้เลแวนที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยและการกระจายตัวของขนาดโมเลกุลที่ค่อนข้างแคบ (ภาพที่ 1(B)) และสูตรอาหาร BSMY สามารถส่งผลให้ได้เลแวนในปริมาณมากและมีการกระจายตัวของขนาดโมเลกุลที่กว้างและแตกต่างกันค่อนข้างมาก ดังแสดงในภาพที่ 1(C) ดังนั้น หากต้องการผลิตเลแวนให้ได้ปริมาณมากและมีขนาดโมเลกุลที่หลากหลายควรเลือกใช้สูตรอาหาร BSMY

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย

สูตรอาหาร	% ซูโครส	RPM	ปริมาตรส่วนใส : เอทานอล ในการตกตะกอน
NB	10%	180	1:2 เท่า
BSM			1:2 เท่า
BSMY			1:2 เท่า



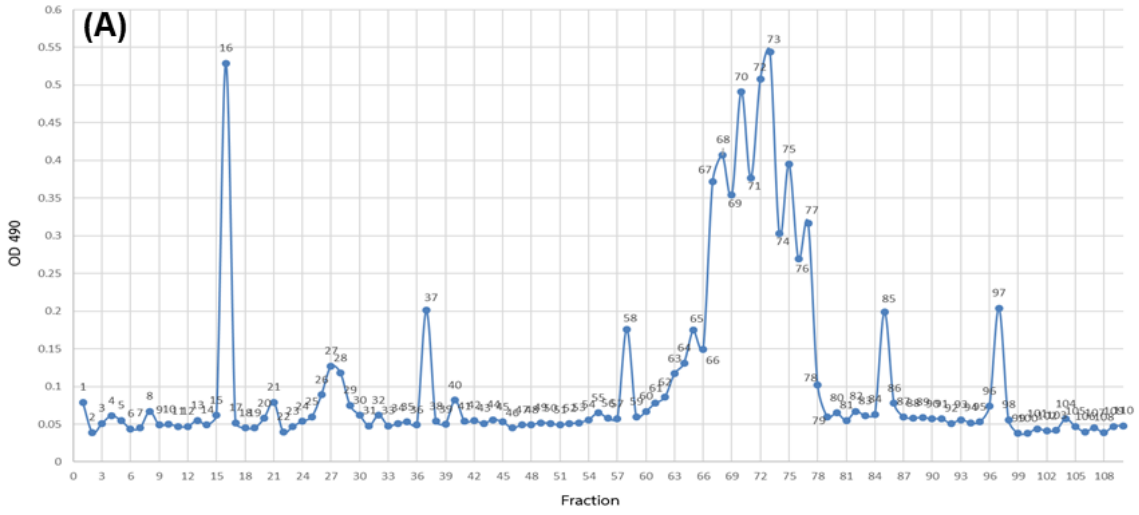
ภาพที่ 1 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (A) สูตรอาหาร NB (B) สูตรอาหาร BSM และ (C) สูตรอาหาร BSMY

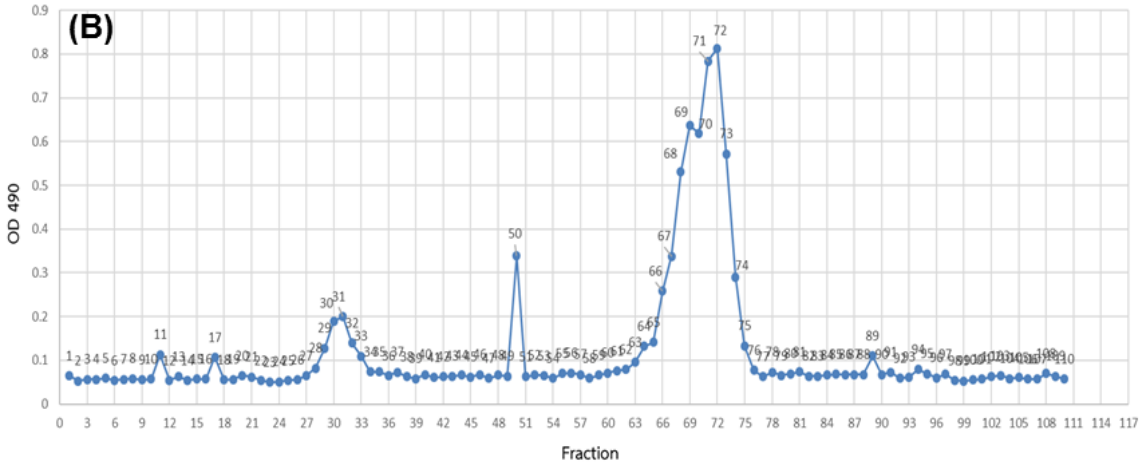
(2) ผลของเปอร์เซ็นต์ซูโครสในสูตรอาหาร BSM ต่อปริมาณและขนาดโมเลกุลของเลแวน

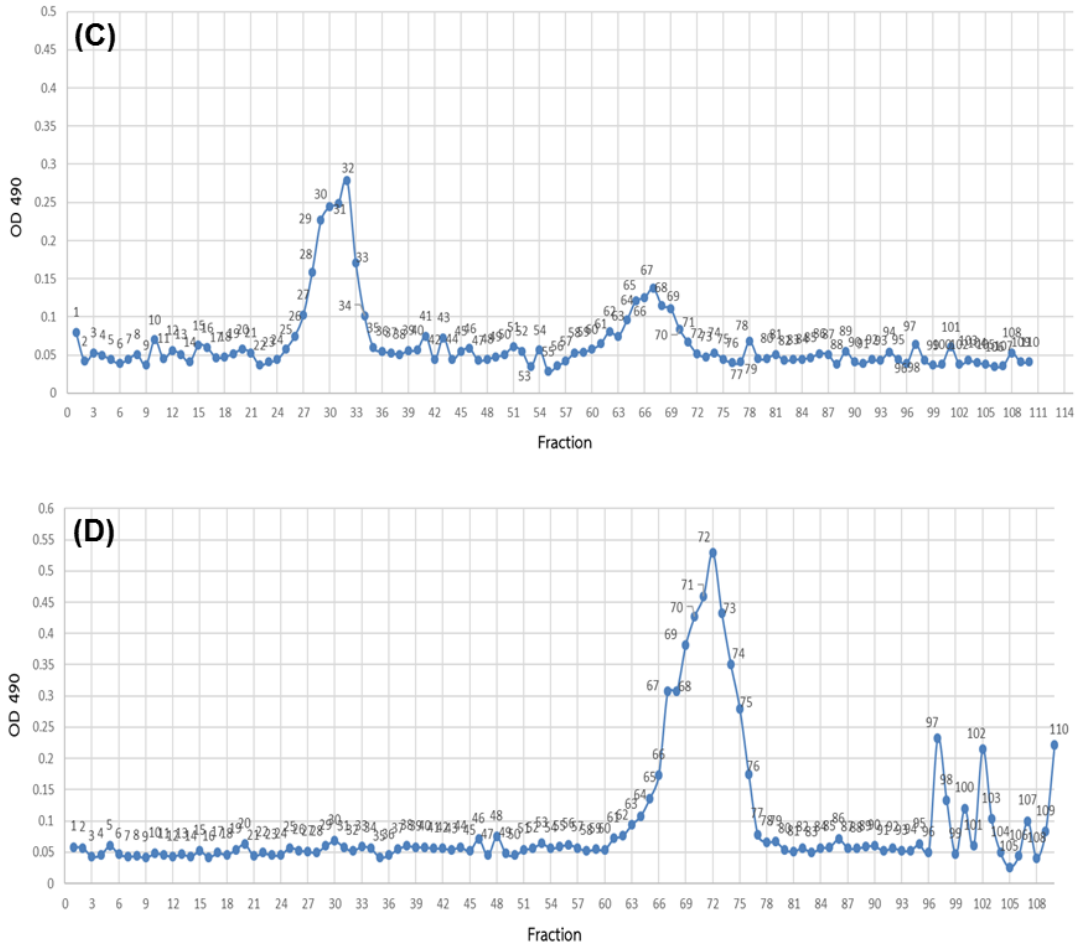
จากการใช้เปอร์เซ็นต์ซูโครสที่แตกต่างกันในสูตรอาหาร BSM (ตารางที่ 2) พบว่าส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์เลแวนที่มีช่วงขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในภาพที่ 2(A)-(D) ซึ่งการใช้ 15% ซูโครสในสูตรอาหาร BSM จะทำให้ได้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ในปริมาณที่มากกว่าการใช้ 8% 10% และ 25% ซูโครส ตามลำดับ (ภาพที่ 2-(C)) ทั้งนี้ การเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซูโครสไปเป็น 25% จะส่งผลให้ได้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 2-(D))

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ซูโครสที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร BSM ที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis*

สูตรอาหาร	% ซูโครส	RPM	ปริมาตรส่วนใส : เอทานอล ในการตกตะกอน
BSM	8%	180	1:2 เท่า
	10%		
	15%		
	25%		







ภาพที่ 2 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSM ที่มีซูโครสแตกต่างกัน (A) 8% (w/v) (B) 10% (w/v) (C) 15% (w/v) และ (D) 25% (w/v)

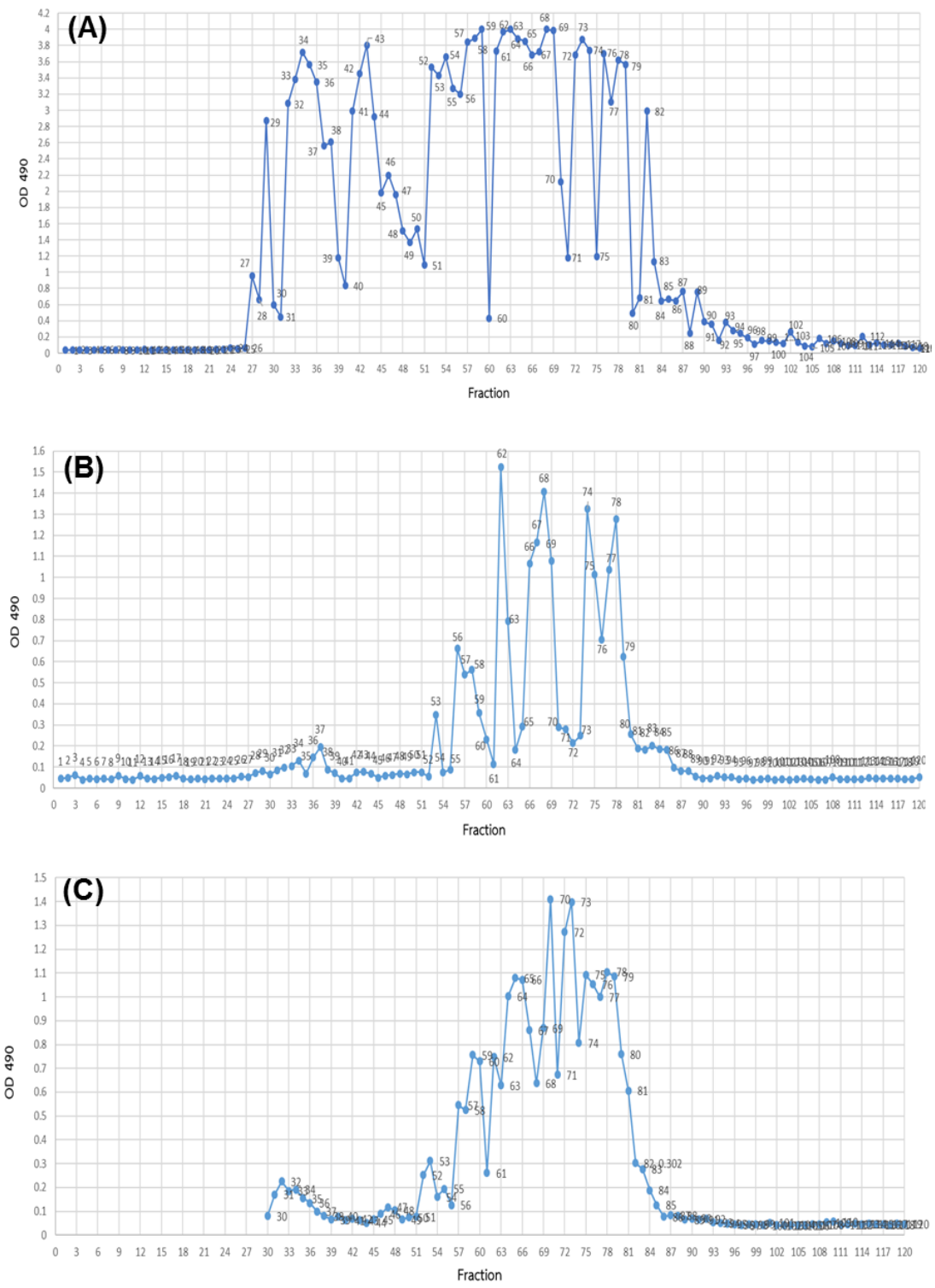
(3) ผลของเปอร์เซ็นต์ซูโครสในสูตรอาหาร BSMY ต่อเลแวนที่เกิดขึ้น

จากการใช้เปอร์เซ็นต์ซูโครสที่แตกต่างกันในสูตรอาหาร BSMY พร้อมกับการตกตะกอนเลแวนโดยใช้เอทานอลในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) พบว่าการใช้ 10% ซูโครส ในอาหาร BSMY พร้อมกับการตกตะกอนด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:2 เท่า จะส่งผลให้ได้เลแวนที่มีขนาดใหญ่ในปริมาณมากกว่าเปอร์เซ็นต์อื่น ดังแสดงในภาพที่ 3(A) การเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซูโครสจาก 10% ไปเป็น 25% ส่งผลให้ได้เลแวนที่มีขนาดเล็กในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 3(B) และ 3(C) ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซูโครสจะส่งผลให้ได้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในข้อที่ (2) การเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซูโครสในสูตรอาหาร BSM จะทำให้ได้ปริมาณเลแวนที่มีขนาดเล็กเพิ่มมากขึ้น

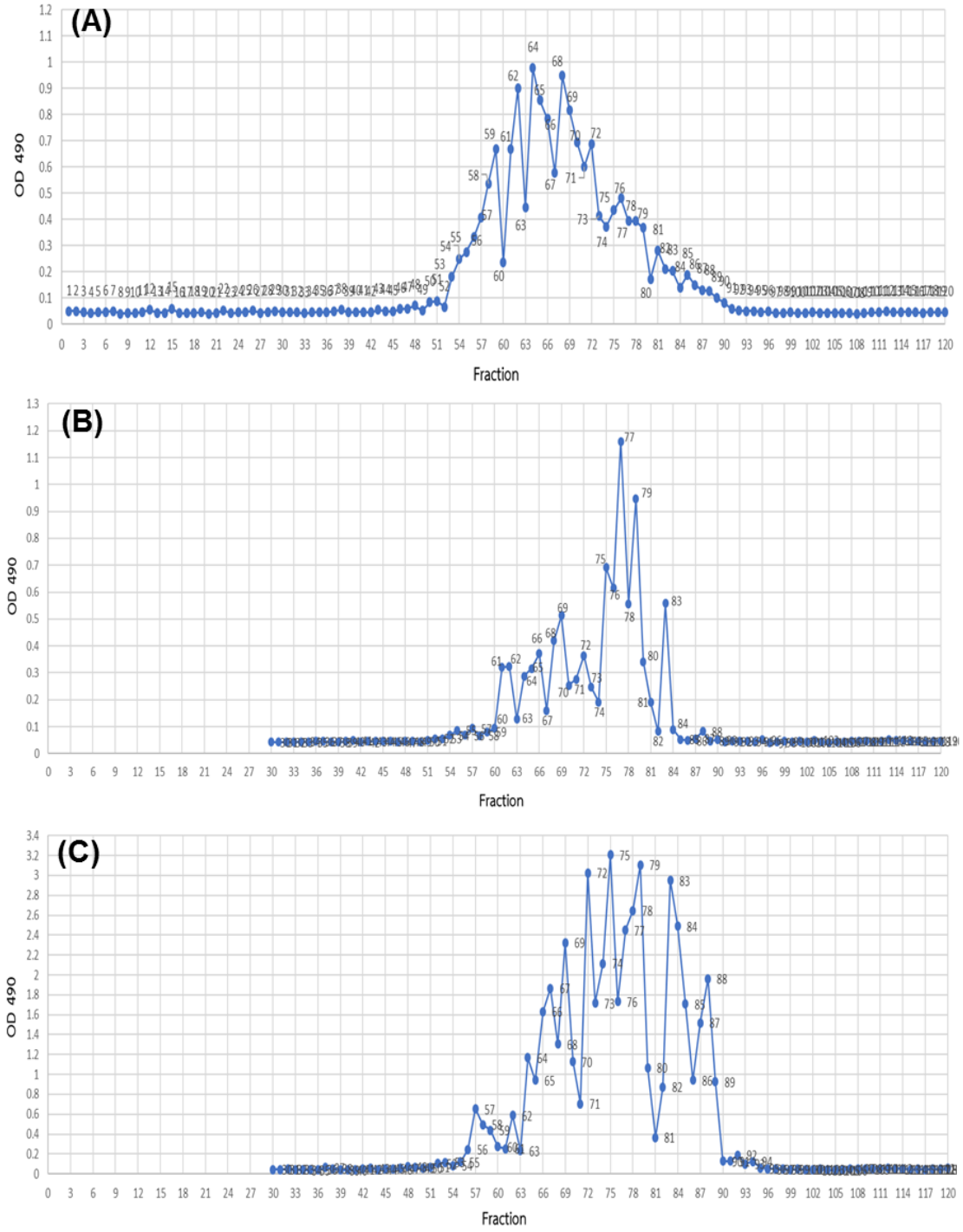
จากการตกตะกอนเลแวนซ้ำสองรอบควบคู่ไปกับการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซูโครสในอาหาร BSMY พบว่าไม่ได้ส่งผลต่อขนาดเลแวนที่ได้รับอย่างชัดเจนนัก โดยเลแวนที่ได้ส่วนใหญ่ยังคงเป็นเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลค่อนข้างเล็ก ดังแสดงในภาพที่ 4(A)-(C) แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกตกตะกอนด้วยเอทานอลไปในรอบแรกแล้ว

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ซูโครสที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร BSMY ที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis*

สูตรอาหาร	**% ซูโครส**	**RPM**	**ปริมาตรส่วนใส : เอทานอล เพื่อตกตะกอนเลแวน**
BSMY	10% 15% 25%	180	ตกตะกอนด้วยเอทานอล 1 : 2 เท่า
	10% 15% 25%	180	นำส่วนใสเดิมมาตกตะกอนด้วยเอทานอล 1 : 2 เท่า ซ้ำรอบสอง



ภาพที่ 3 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มีซูโครสแตกต่างกัน (A) 10% (w/v) (B) 15% (w/v) (C) 25% (w/v) และผ่านการตกตะกอนด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:2 จำนวนหนึ่งรอบ



ภาพที่ 4 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มีซูโครสแตกต่างกัน และผ่านการนำส่วนใสเดิมไปตกตะกอนด้วยเอทานอล ซ้ำรอบที่สอง (A) 10% (w/v) (B) 15% (w/v) (C) 25% (w/v)

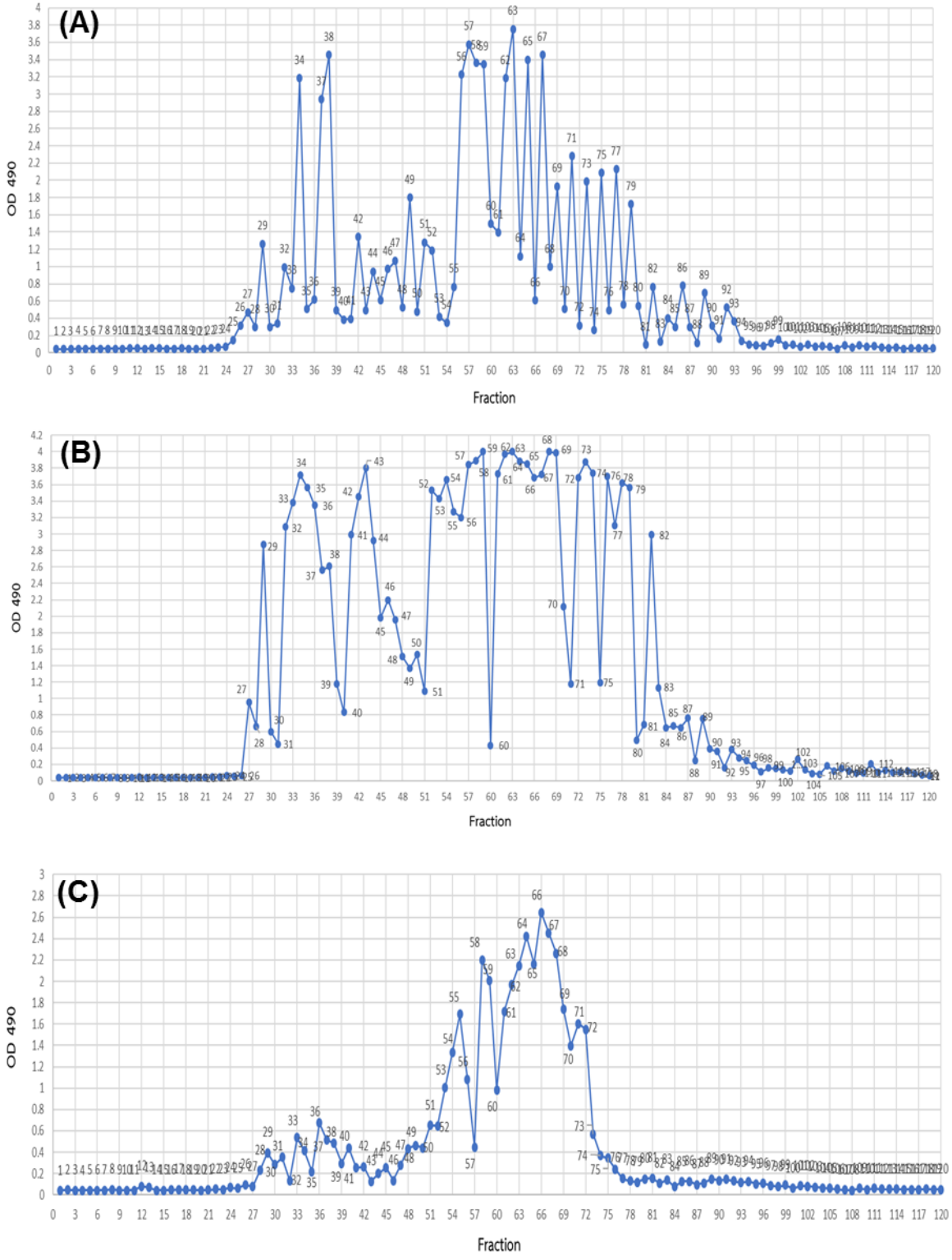
(4) ผลของอัตราการเขย่าต่อเลแวนที่เกิดขึ้น

จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครสเป็นองค์ประกอบโดยใช้อัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ผลการทดลองที่ได้พบว่าการใช้อัตราการเขย่าที่ 180 RPM ส่งผลให้ได้เลแวนที่มีการกระจายของขนาดโมเลกุลที่กว้างและมีขนาดโมเลกุลใหญ่ในปริมาณมากที่สุด รองลงมา คือที่ 100 RPM และ 250 RPM ตามลำดับ (ภาพที่ 5(A)-(C)) ทั้งนี้ การใช้อัตราเร็วในการเขย่าเท่ากับ 250 RPM จะส่งผลให้ได้เลแวนที่มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 5(C))

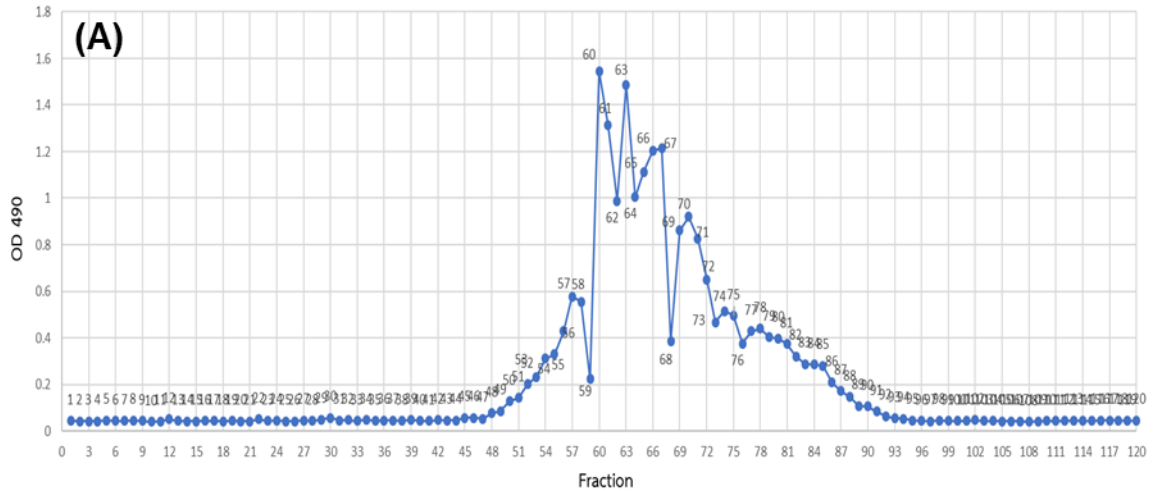
การเพิ่มอัตราเร็วในการเขย่าจาก 100 RPM ไปเป็น 250 RPM ควบคู่ไปกับการตกตะกอนส่วนใสเดิมด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:2 ซ้ำรอบสอง ไม่ได้ส่งผลต่อขนาดเลแวนที่ได้รับ โดยเลแวนที่ได้ส่วนใหญ่ยังคงเป็นเลแวนขนาดเล็ก (ภาพที่ 6(A)-(C))

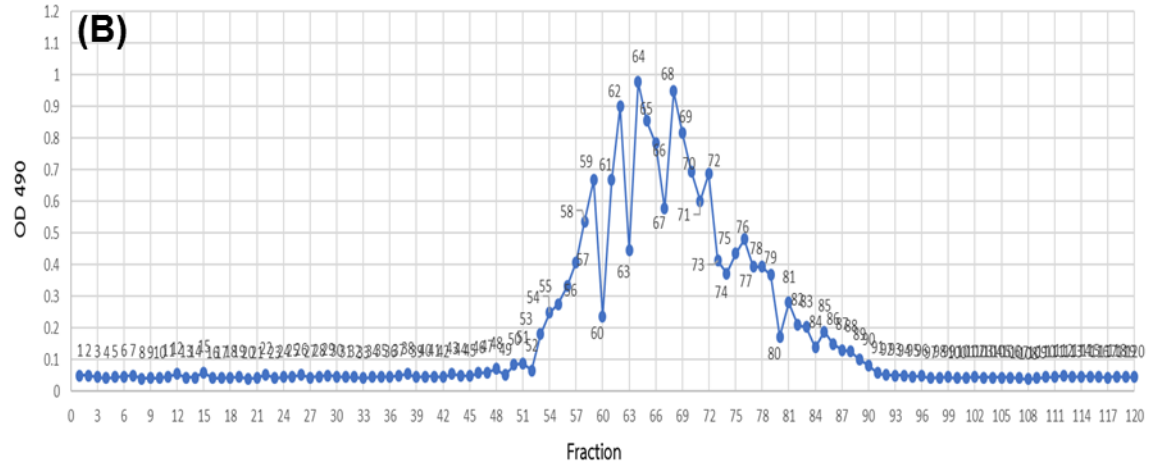
ตารางที่ 4 อัตราเร็วในการเขย่าที่แตกต่างกันที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis*

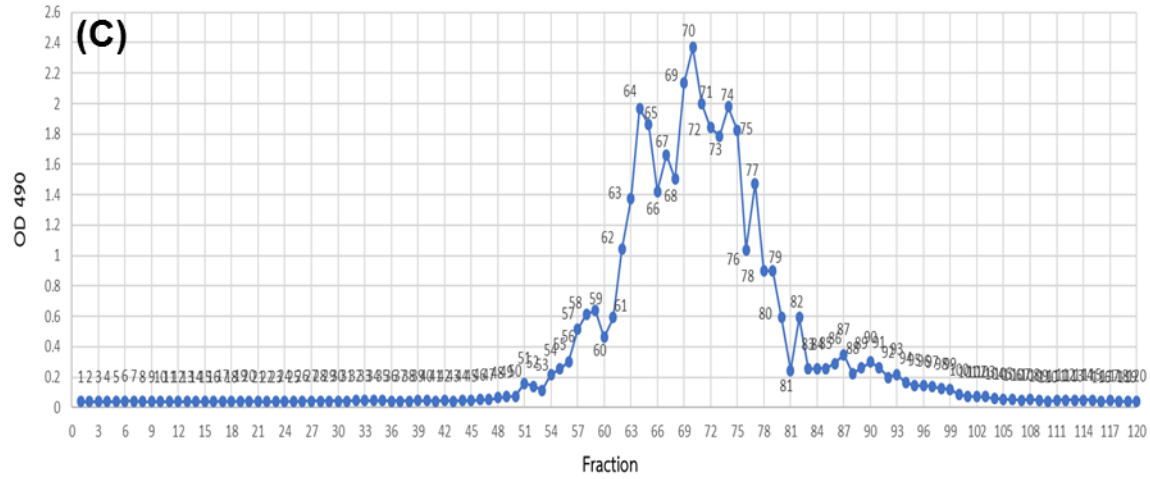
สูตรอาหาร	% ซูโครส	RPM	ปริมาตรส่วนใส : เอทานอล ในการตกตะกอน
BSMY	10%	100	1:2 เท่า รอบที่ 1
		180	
		250	
		100	ใช้ส่วนใสเดิมมาตกตะกอน 1:2 เท่า รอบที่สอง
		180	
		250	



ภาพที่ 5 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครส และใช้ความเร็วรอบ (RPM) ในการเขย่าที่แตกต่างกัน (A) 100 RPM (B) 180 RPM (C) 250 RPM และผ่านการตกตะกอนด้วยเอทานอล 1:2 จำนวนหนึ่งรอบ







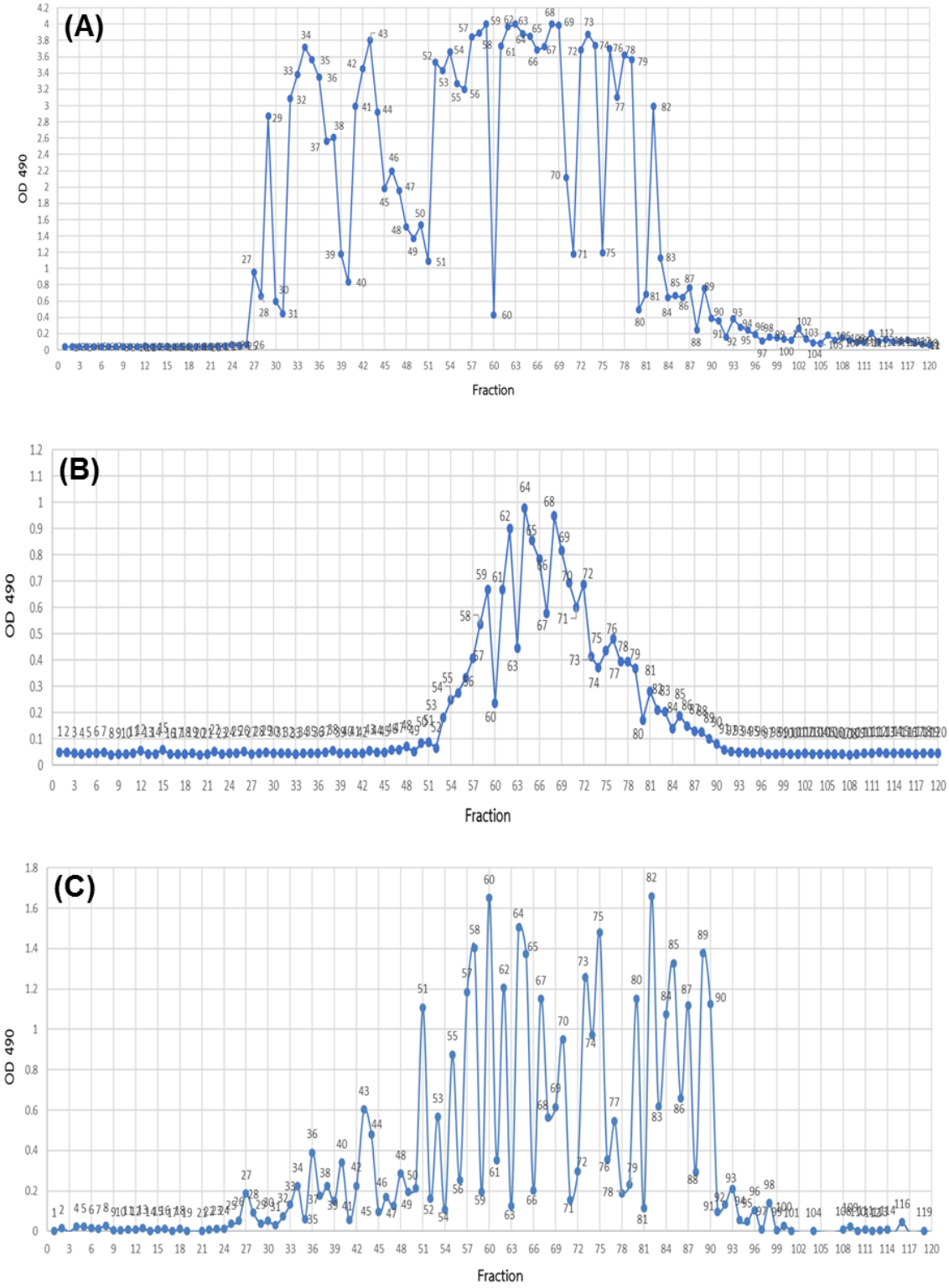
ภาพที่ 6 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครส และใช้ความเร็วรอบ (RPM) ในการเขย่าที่แตกต่างกัน และผ่านการนำส่วนใสเดิมไปตกตะกอนด้วยเอทานอลซ้ำรอบสอง (A) 100 RPM (B) 180 RPM (C) 250 RPM

(5) ผลของปริมาตรเอทานอลที่ใช้ในการตกตะกอนต่อเลแวนที่เกิดขึ้น

จากการทดลองตกตะกอนเลแวนโดยใช้ปริมาตรเอทานอลในอัตราส่วนและจำนวนรอบที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 ผลการทดลองที่ได้พบว่าการเพิ่มปริมาตรเอทานอลเพื่อตกตะกอนเลแวนจะส่งผลให้ได้ปริมาณเลแวนที่เพิ่มขึ้น โดยการใช้เอทานอลในอัตราส่วน 1:4 เท่าจะทำให้ปริมาณเลแวนที่มากกว่าการใช้เอทานอลในอัตราส่วน 1:2 เท่า ทั้งนี้ โมเลกุลส่วนใหญ่จะค่อนไปทางกลางถึงเล็ก ดังแสดงในภาพที่ 7(C) และ 7(A) ตามลำดับ ทั้งนี้ การนำส่วนใสเดิมมาตกตะกอนซ้ำรอบที่ 2 จะทำให้สามารถ recover เลแวนขนาดเล็กที่หลงเหลืออยู่ในส่วนใสหลังจากการตกตะกอนเพียงหนึ่งรอบได้ ดังแสดงในภาพที่ 7(B) อย่างไรก็ตาม จากการนำเลแวนขนาดเล็กดังกล่าวไปทดสอบด้วย TLC พบว่ามีโมเลกุลของซูโครสปนเปื้อนมาด้วย (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้)

ตารางที่ 5 การตกตะกอนเลแวนโดยใช้ปริมาตรของเอทานอลในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

สูตรอาหาร	% ซูโครส	RPM	ปริมาตรส่วนใส : เอทานอล ในการตกตะกอน
BSMY	10%	180	1:2 เท่า
			1:2 เท่า ซ้ำรอบสอง (ใช้ส่วนใสเดิม)
			1:4 เท่า

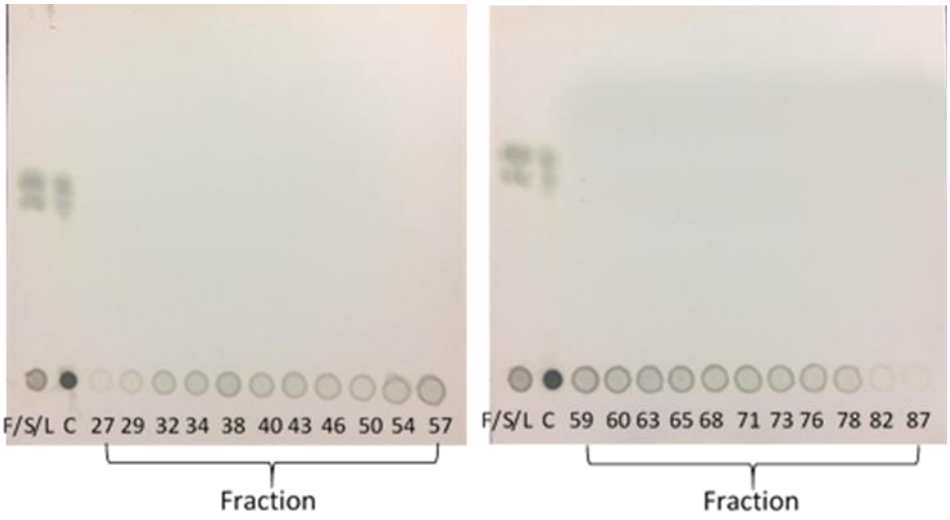


ภาพที่ 7 เจลฟิลเตรชันโครมาโทแกรมของคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR แสดงถึงเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BSMY ที่มี 10% ซูโครส ใช้อัตราการเขย่า 180 RPM และผ่านการนำส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเอทานอล ในอัตราส่วนและ/หรือจำนวนรอบที่แตกต่างกัน (A) 1:2 เท่า (B) 1:2 เท่า ส่วนใสเดิมตกตะกอนซ้ำรอบสอง (C) 1:4 เท่า*

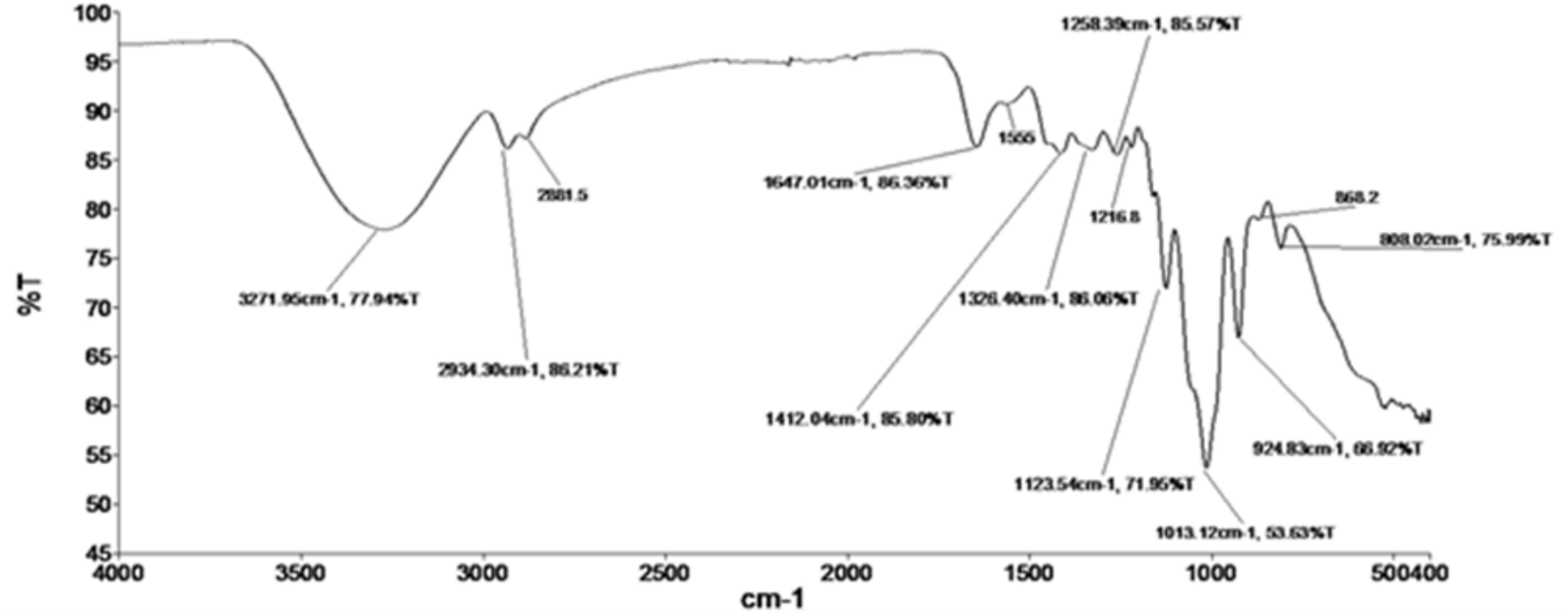
* ปริมาตรที่ใช้ในการติดตามแฟรกชันด้วย Phenol-sulfuric assay น้อยกว่า (A) และ (B) อยู่ 4 เท่า

2. การศึกษาโครงสร้างเลแวนที่ได้โดยเทคนิค TLC และ FT-IR

จากการนำแต่ละแฟรกชันของตะกอนเลแวนที่ได้จากการแยกขนาดโมเลกุลด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR มาทำการยืนยันว่าเป็นฟรุกโทสพอลิเมอร์โดยเทคนิค TLC โดยหลังจากการนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Urea-HCl จะพบสปอตสีเทาเกิดขึ้นที่บริเวณจุดเริ่มต้นของแผ่น TLC แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ในแต่ละแฟรกชันนั้นมีพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโทสเป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 8 นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis* ด้วยเทคนิค FT-IR จะพบหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H, C=O ตลอดจนพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งแสดงถึงการมีอยู่ของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 8 TLC โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เลแวนแต่ละแฟรกชันที่ได้การแยกด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR โดยมีระบบตัวทำละลาย (solvent syntem) คือ บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (5:3:1.5) ย้อม TLC ด้วย Urea : HCl โดย F/S/L คือ สปอตของฟรุกโทส ซูโครส และเลแวนมาตรฐาน ตามลำดับ C คือ crude levan ก่อนแยกด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-300 HR



ภาพที่ 9 FT-IR spectrum ของเลแวนที่ได้ผลิตจาก *Bacillus subtilis*

3. การตรวจสอบขนาดโมเลกุล (MW) ของเลแวนด้วยเทคนิค HPGPC

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเลแวนให้ได้ขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน ได้ทำการนำโมเลกุลเลแวนที่ได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันมาแยกโดยผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชัน Sephacryl S-300 HR จากนั้นไปวิเคราะห์หาค่าขนาดโมเลกุล (MW) ด้วยเทคนิค HPGPC โดยใช้ TSKgel column และมีน้ำกลั่นเป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้ RI-detector ติดตามเลแวนแต่ละขนาด โดยมีสารละลาย pullulan ที่ขนาดแตกต่างกันเป็นสารมาตรฐาน ผลที่ได้พบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตเลแวนที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยในโครงงานนี้ ได้คัดเลือกเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันจำนวนสามขนาด ได้แก่ >8x10^5 1.5x10^4 และ 5x10^3 ดาลตัน เพื่อใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านอักเสบในเซลล์ RAW264.7 macrophage และได้กำหนดชื่อของโมเลกุลของเลแวนทั้งสามขนาดนี้ว่า M1 M2 และ M3 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ขนาดโมเลกุลของเลแวนที่ได้จาก *B. subtilis*

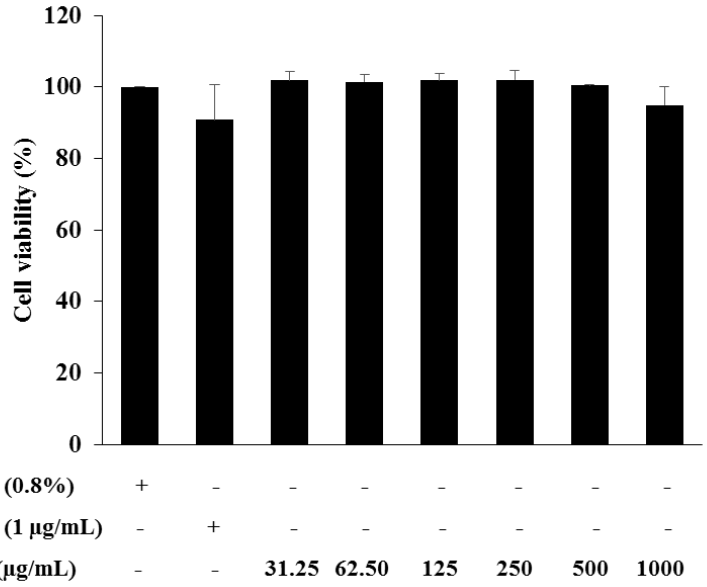
โมเลกุลเลแวน	**ขนาดโมเลกุล (Dalton) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPGPC**
M1	>8x10^5
M2	1.5x10^4
M3	5x10^3

4. การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน

จากการทดสอบความเป็นพิษหรือ cytotoxicity test ของเลแวนทั้งสามขนาด คือ M1 M2 และ M3 ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิด RAW 264.7 macrophage โดยวิธี MTT พบว่าการบ่มเลแวน M1 กับเซลล์ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 10 ตามลำดับ ในขณะที่เลแวน M2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25-250 μg/mL ไม่ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เลแวน M2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 และ 1,000 μg/mL จะลดความมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 11 ตามลำดับ และการใช้เลแวน M3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25-1,000 ug/mL ไม่ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS ดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 12 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

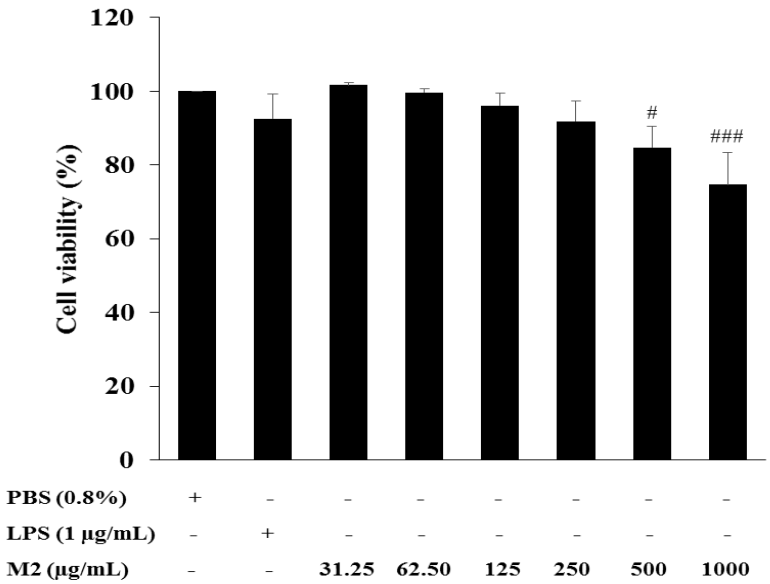
Treat	% cell viability				
	M1_alone_1 23/12/2563	M1_alone_2 11/02/2564	M1_alone_3 12/02/2564	Average	SD
PBS 0.8%	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
LPS 1 ug/ml	79.69	98.04	94.75	90.83	9.78
M1 31.25 ug/mL	104.09	102.22	99.27	101.86	2.43
M1 62.5 ug/mL	102.96	102.32	99.31	101.53	1.95
M1 125 ug/mL	103.69	102.29	99.74	101.91	2.01
M1 250 ug/mL	104.40	102.43	99.22	102.02	2.61
M1 500 ug/mL	100.64	100.36	100.48	100.49	0.14
M1 1000 ug/mL	89.06	98.49	97.21	94.92	5.12



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 μg/mL ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำสามครั้ง (triplicate)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

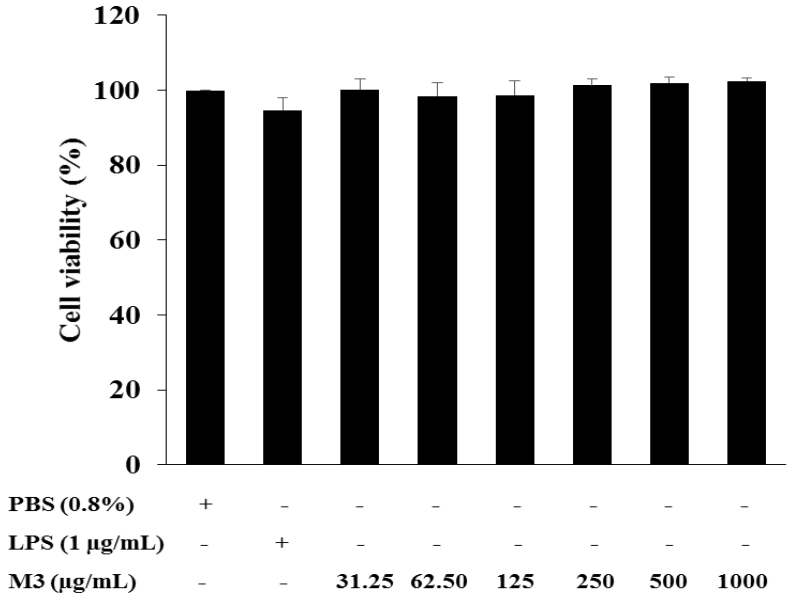
Treat	% cell viability				
	M2_alone_1 23/12/2563	M2_alone 2_11/02/2564	M2_alone 3_12/02/2564	Average	SD
PBS 0.8%	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
LPS 1 ug/ml	85.00	97.94	94.78	92.57	6.75
M1 31.25 ug/mL	102.26	100.97	101.98	101.74	0.68
M1 62.5 ug/mL	98.48	99.81	100.74	99.68	1.14
M1 125 ug/mL	92.51	97.61	98.44	96.19	3.21
M1 250 ug/mL	85.65	94.18	95.92	91.91	5.50
M1 500 ug/mL	78.29	87.64	88.53	84.82	5.67
M1 1000 ug/mL	64.63	79.22	80.25	74.70	8.74



ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/mL ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำสามครั้ง (triplicate) กำหนดให้ #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Treat	% cell viability				
	M3_alone 1 23/12/2563	M3_alone 2 11/02/2564	M3_alone3 12/02/2564	Average	SD
PBS 0.8%	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
LPS 1 ug/ml	err	96.97	92.47	94.72	3.18
M3 31.25 ug/mL	97.32	100.52	102.78	100.21	2.74
M3 62.5 ug/mL	94.18	100.65	100.43	98.42	3.67
M3 125 ug/mL	94.46	102.25	99.31	98.67	3.93
M3 250 ug/mL	99.63	101.63	102.81	101.35	1.61
M3 500 ug/mL	103.65	101.27	101.11	102.01	1.42
M3 1000 ug/mL	102.09	102.07	103.37	102.51	0.75

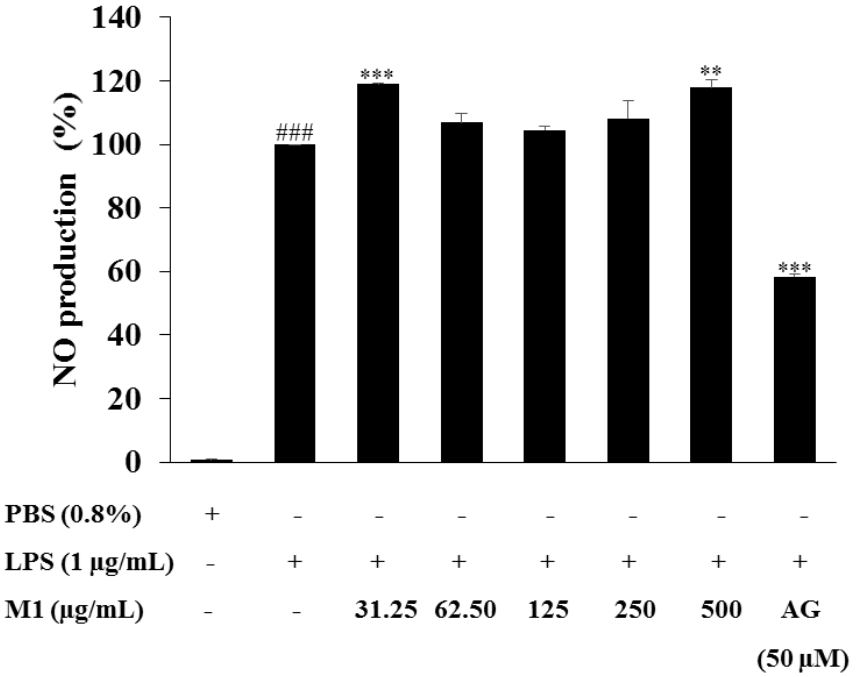


ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/mL ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำสามครั้ง (triplicate)

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านอักเสบของเลแวนที่มีขนาดต่างกัน

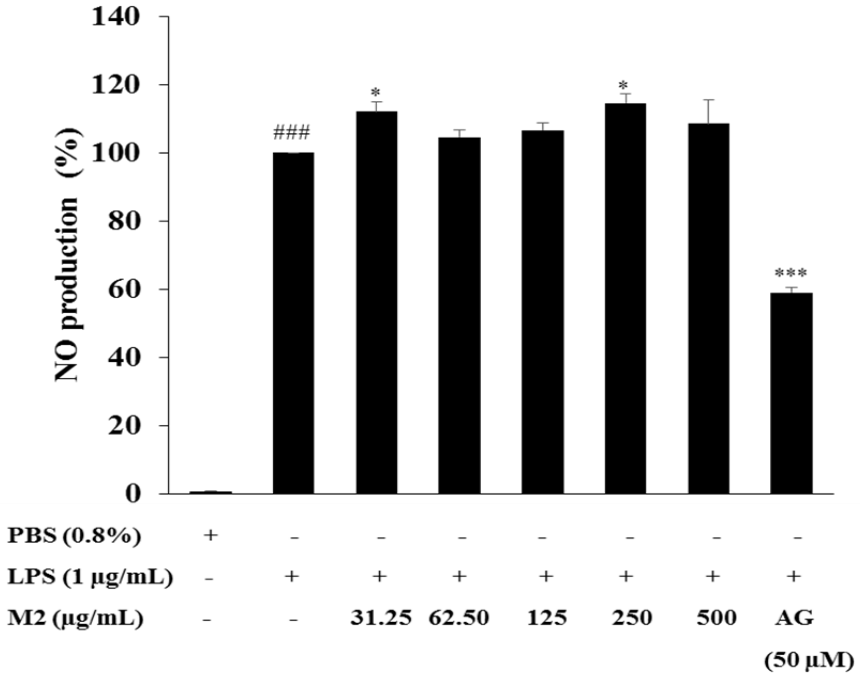
ในการศึกษาความสามารถในการต้านอักเสบของเลแวนขนาด M1 M2 และ M3 โดยวัดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS (lipopolysaccharide) โดยใช้ปริมาณไนไตรท์ (nitrite) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ เป็นตัวบ่งชี้แอกทิวิตีของเอนไซม์ iNOS ซึ่งในการทดลองจะวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยา Griess และมี aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS เป็นสารควบคุมแบบบวก (positive control) ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลองอย่างน้อยสองครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (triplicate) และวิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้โดยเปรียบเทียบแบบ two one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

ผลการทดลองที่ได้พบว่าเซลล์ที่ได้รับ LPS เพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบควบคู่ไปกับการได้รับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25-500 μg/mL ยังคงมีการผลิตไนตริกออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น (M1 เท่ากับ 31.25 μg/mL) หรือใกล้เคียง (M2 เท่ากับ 62-250 μg/mL) กับเซลล์ที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังนั้นเลแวน M1 ไม่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ได้ (ภาพที่ 13) ในขณะที่ AG ซึ่งเป็นสารควบคุมเชิงบวก สามารถยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS ร่วมกับเลแวน M1 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL *###,* $p < 0.001$ เทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ และ ***$p < 0.001$ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเพียงแค่ LPS; AG, aminoguanidine

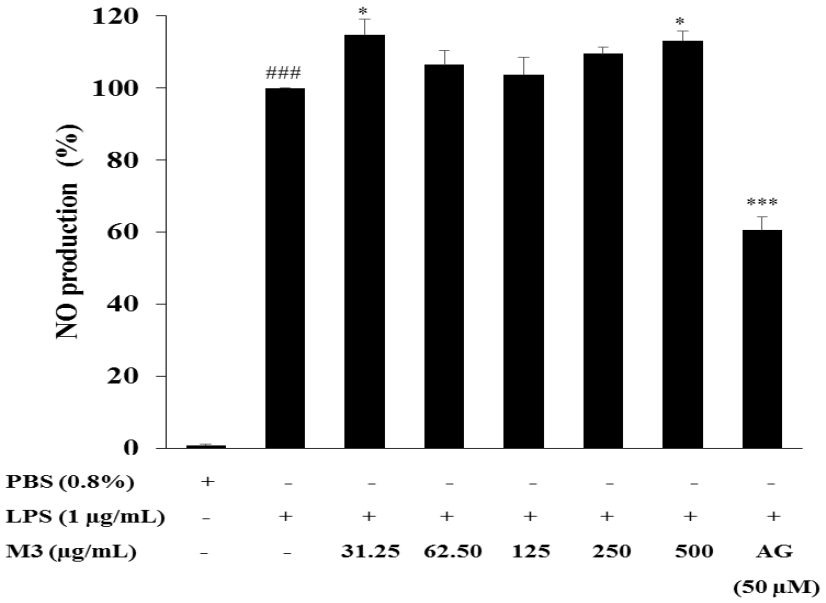
ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับ LPS ควบคู่ไปกับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL ยังคงมีการผลิตไนตริกออกไซด์ในเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่า (31.25 และ 250 μg/mL) หรือใกล้เคียงกับเซลล์ที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังนั้น สารเลแวน M2 ไม่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ได้ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS ร่วมกับเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL *###,* $p < 0.001$ เทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ และ ***$p < 0.001$ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเพียงแค่ LPS; AG, aminoguanidine

ในทำนองเดียวกันกับ M1 และ M2 เซลล์ที่ได้รับ LPS ควบคู่กับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 μg/mL ยังคงมีการผลิตไนตริกออกไซด์ในเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าหรือใกล้เคียงกับเซลล์ที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังนั้น สารเลแวน M3 ไม่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ได้ ดังแสดงในภาพที่ 15

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเลแวนทั้งสามขนาด คือ M1 M2 และ M3 ไม่มีการแสดงออกของฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านทางกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ RAW 264.7 macrophage ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS ร่วมกับเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-500 µg/mL *###,* $p < 0.001$ เทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ และ ***$p < 0.001$ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเพียงแค่ LPS; AG, aminoguanidine

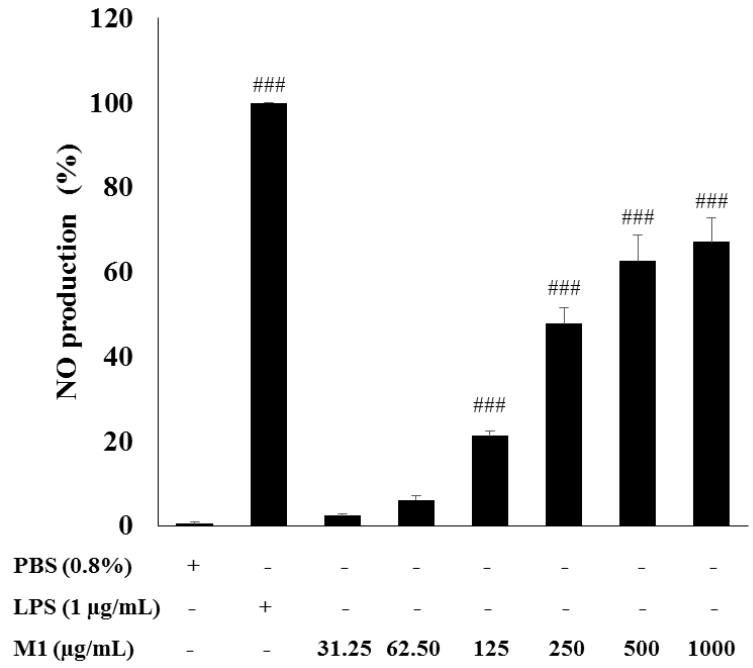
6. การทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์โดยเลแวนที่มีขนาดต่างกัน

เนื่องจากเลแวนขนาด M1 M2 และ M3 ไม่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW macrophage 264.7 ที่ได้รับ LPS ได้ ทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบว่าเลแวน M1 M2 และ M3 สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญและมีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยได้ treat เซลล์กับเลแวนที่มีขนาดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นติดตามการผลิตไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาของ Greiss

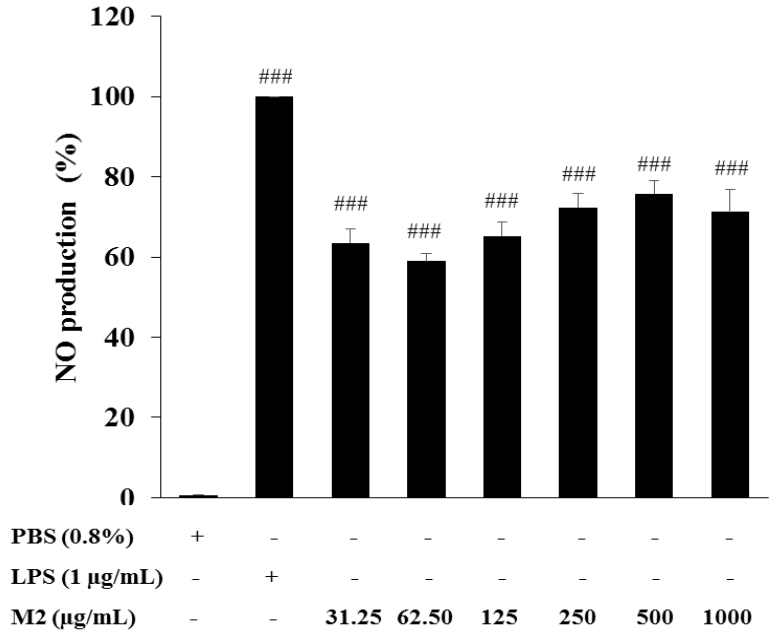
ผลที่ได้พบว่าเลแวน M1 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 125 µg/mL เป็นต้นไป สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ treat ด้วย 0.8% PBS การเพิ่มความเข้มข้นของ M1 ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ จึงมีการแสดงออกถึง dose-dependent effect ของเลแวน M1 ดังแสดงในภาพที่ 16

ในขณะที่เลแวน M2 สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25 µg/mL การเพิ่มความเข้มข้นของ M2 จาก 31.25 ไปเป็น 500 µg/mL ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้ หากเพิ่มความเข้มข้นของ M2 ไปถึง 1,000 µg/mL จะไม่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์โดย M2 มีค่าเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าการกระตุ้นโดย M1 ดังแสดงในภาพที่ 17

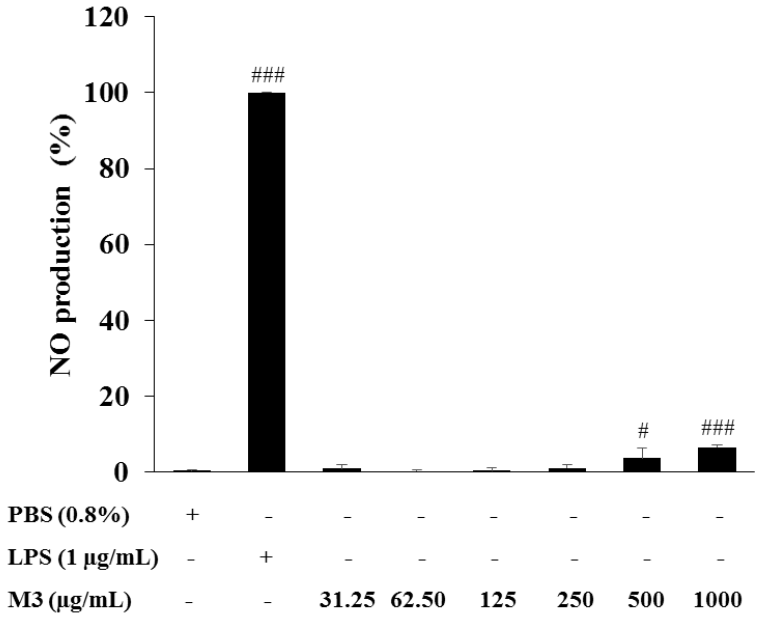
การใช้เลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-250 µg/mL ไม่สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ แต่การใช้ความเข้มข้น M3 ที่ช่วงระหว่าง 500-1,000 µg/mL จะสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้เล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 18 ดังนั้น จะเห็นได้ว่าความสามารถในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ของ M3 มีเปอร์เซ็นต์ที่น้อยกว่าการใช้ M1 และ M2 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้น ขนาดโมเลกุลของเลแวนที่แตกต่างกัน สามารถส่งผลต่อการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ใน RAW264.7 macrophage cells ที่ต่างกัน โดย M2 มีแนวโน้มในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ M1 และ M3 ตามลำดับ



ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS หรือเลแวน M1 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/mL #, p < 0.05; ##, p < 0.01; *###,* p < 0.001 เทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS หรือเลแวน M2 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/mL #, p < 0.05; ##, p < 0.01; *###,* p < 0.001 เทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับ LPS หรือเลแวน M3 ที่ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/mL #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; *###,* $p < 0.001$ เทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.8% PBS

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดโมเลกุลของเลแวนที่ *Bacillus subtilis* สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของซูโครส อัตราการเขย่า (RPM) และปริมาตรเอทานอลที่ใช้ในการตกตะกอนเลแวน พบว่าการใช้สูตรอาหาร BSMY จะส่งผลให้ได้เลแวนที่มีการกระจายตัวของขนาดโมเลกุลที่ค่อนข้างกว้าง มีทั้งขนาดโมเลกุลใหญ่และเล็ก โดยตะกอนเลแวนที่ได้นี้มีปริมาณมากและสามารถละลายน้ำได้ดี ในขณะที่การใช้สูตรอาหาร NB จะได้เลแวนขนาดโมเลกุลเล็กจำนวนมาก และการใช้สูตรอาหาร BSM จะส่งผลให้ได้ตะกอนเลแวนที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าสูตรอื่น และตะกอนเลแวนที่ได้มีความสามารถในการละลายน้ำทีต่ำ แต่ขนาดโมเลกุลที่ได้จะค่อนไปทางขนาดใหญ่มากกว่าเลแวนที่พบใน NB และ BSMY ดังนั้น การเลือกใช้สูตรอาหารจึงมีผลต่อขนาดโมเลกุลของเลแวนที่เกิดขึ้น

จากการศึกษาผลของซูโครสในสูตรอาหาร BSM ต่อเลแวนที่เกิดขึ้น พบว่าการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซูโครสจาก 8% ไปเป็น 10% และ 15% จะสามารถผลิตเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มซูโครสไปจนถึง 25% เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กลับมีปริมาณที่ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการที่มีสารตั้งต้นซูโครสที่มากเกินไป อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เลแวนซูเครส โดยเฉพาะในขั้นตอนของการเกิดปฏิกิริยา Transfructosylation ส่งผลให้เลแวนที่ได้มีขนาดเล็กลง ทั้งนี้ จำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ต่อไป

จากการศึกษาผลของอัตราการเขย่าต่อเลแวนที่เกิดขึ้น พบว่าการใช้อัตราการเขย่าที่ 180 RPM จะสามารถผลิตเลแวนได้ช่วงขนาดโมเลกุลที่กว้างและมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าที่ 100 และ 250 RPM ตามลำดับ เนื่องจากการใช้อัตราการเขย่าที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ *B. subtilis* ได้รับ โดย *B. subtilis* จัดเป็น aerobic bacteria ที่ต้องอาศัยแก๊สออกซิเจนในการเติบโต ดังนั้น หากมีอัตราการเขย่าที่ต่ำ อาจส่งผลให้การผลิตเลแวนลดน้อยลง เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่าที่ควร นอกจากนี้ การใช้ความเร็วที่สูง เช่น ที่ 250 RPM พบว่าปริมาณและขนาดโมเลกุลเลแวนที่เกิดขึ้นลดลงเมื่อเทียบกับ 180 RPM ซึ่งเป็นไปได้ว่าการใช้อัตราเร็วเขย่าที่สูงเกินไป อาจส่งผลให้ปฏิกิริยา Transfructosylation เกิดได้ไม่ดี ทำให้ขนาดโมเลกุลของเลแวนที่ได้มีขนาดสั้นเป็นส่วนใหญ่

จากการศึกษาการตกตะกอนเลแวนโดยใช้ปริมาตรเอทานอลที่แตกต่างกัน พบว่าการตกตะกอนเลแวนด้วยใช้ปริมาตรเอทานอลเป็น 4 เท่าของปริมาตรส่วนใส จะทำให้ได้ปริมาณตะกอนเลแวนออกมามากที่สุด และได้ช่วงขนาดโมเลกุลที่มีการกระจายตัวที่กว้างกว่าการใช้ปริมาตรเอทานอล 2 เท่า ในขณะที่การนำส่วนใสเดิมมาตกตะกอนซ้ำรอบสองด้วยเอทานอล 2 เท่า จะทำให้ได้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กที่หลงเหลือในระบบ อย่างไรก็ตาม แม้จะได้เลแวนในปริมาณที่มากขึ้น พบว่ามีโมเลกุลของฟรุกโทสกับซูโครสปนเปื้อนมาด้วย ทั้งนี้ งานวิจัยก่อนหน้าได้แสดงให้เห็นว่าการใช้ปริมาตรเอทานอลในการตกตะกอนเป็น 1:2 เท่า และ 1:4 เท่า จะทำให้สามารถแยกเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน คือ 1,794 และ 11 kDa ออกจากกันได้ (Shih et al., 2005)

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของซูโครส อัตราการเขย่า (RPM) และปริมาตรเอทานอลที่ใช้ในการตกตะกอนเลแวน ล้วนส่งผลต่อปริมาณและขนาดโมเลกุลของเลแวนที่ได้รับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเลแวนจาก *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของซูโครส pH อุณหภูมิที่ใช้ และอัตราในการเขย่า นอกจากนี้ การเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงสามารถช่วยให้ได้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพิ่มมากขึ้น (Wu et al., 2013; Dos Santos et al., 2013)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเลแวนของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* แต่อยู่ในสปีชีส์อื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi โดยอาศัยสภาวะในการเลี้ยงที่ใกล้เคียงกัน แต่มีระยะเวลาในการบ่มเชื้อเท่ากับ 21 ชั่วโมง พบว่าให้ผลผลิตเลแวนที่สูงสุดเท่ากับ 48.4 กรัมต่อลิตร (Shih et al., 2005) ในขณะที่งานวิจัยนี้พบว่าการเลี้ยง *B. subtilis* ในอาหาร BSMY ที่มี 25% ซูโครสเป็นองค์ประกอบแล้วนำส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเอทานอลในปริมาตร 2 เท่า จะได้ปริมาณตะกอนเลแวนสูงสุด เท่ากับ 62.5 กรัมต่อลิตร

จากการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของเลแวนทั้งสามขนาด M1 M2 และ M3 ที่มีต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 พบว่าเลแวน M1 M2 และ M3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25-250 μg/mL ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ และการเพิ่มความเข้มข้นของ M1 และ M3 ไปจนถึง 1,000 μg/mL ไม่ได้ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบพบว่าเลแวนทั้งสามขนาดไม่มีฤทธิ์ในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS จึงแสดงให้เห็นว่าเลแวนทั้งสามขนาดไม่มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงมีความแตกต่างกับงานวิจัยก่อนหน้าโดย Srikanth et al. (2015) ที่รายงานว่าเลแวนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากการทดลองชนิด *in vitro* โดยวิธีการยับยั้งการเกิด protein denaturation (Srikanth et al., 2015) ทั้งนี้ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากโมเดลที่ใช้ในการทดลองนั้นมีความแตกต่างค่อนข้างมาก จึงทำให้ได้ข้อสรุปที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเลแวนทั้งสามขนาดที่ผลิตขึ้นจาก *B. subtilis* มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ เลแวนจึงมีส่วนช่วยกระตุ้นหรือปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immunemodulatory activity) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาโดย Xu et al. (2006) ที่แสดงให้เห็นว่าเลแวนจาก *B. subtilis* (natto) สามารถกระตุ้นการผลิต IL - 12 p40 และ TNF-α ในเซลล์แมคโครฟาจได้ โดยการกระตุ้นของเลแวนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับ Toll-like receptor 4 (TLR 4) อีกทั้งยังสอดคล้องกับงานวิจัยโดยทีมผู้วิจัยที่ได้รายงานก่อนหน้าว่าเลแวนจาก *Tanticharoenia sakaeratensis* สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ได้ (Aramsangtienchai et al., 2020) ดังนั้น เลแวนจากแบคทีเรียจึงจัดเป็นสารตามธรรมชาติที่ช่วย modulate การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน หรือเรียกว่า natural immune modulator

จากการวิเคราะห์ผลของขนาดเลแวนต่อความสามารถในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเลแวนเท่ากัน เลแวน M2 ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ $1.5x10^4$ ดาลตัน จะสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ M1 และ M3 ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ $>8x10^5$ และ $5x10^3$ ดาลตัน ตามลำดับ ทั้งนี้ เลแวน M3 มีค่าเปอรเซ็นต์การกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ที่น้อยกว่า M1 และ M2 ค่อนข้างมาก ผลที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าขนาดโมเลกุลของเลแวนมีผลต่อการดัดแปลงระบบภูมิคุ้มกัน การนำเลแวนไปประยุกต์ใช้เป็นสารทางธรรมชาติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจึงควรมีการคำนึงถึงขนาดโมเลกุลด้วย

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถผลิตเลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันภายใต้การเลี้ยงในสภาวะที่มีปัจจัยที่แตกต่างกัน ได้แก่ สูตรอาหาร เปอร์เซ็นต์ซูโครส และอัตราการเขย่า นอกจากนี้ การตกตะกอนเลแวนโดยใช้สัดส่วนของเอาทานอลที่ต่างกันจะทำให้ได้เลแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน เมื่อนำเลแวนที่ *B. subtilis* สังเคราะห์ขึ้นและมีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันสามขนาด ได้แก่ M1 (>8x10^5 ดาลตัน) M2 (1.5x10^4 ดาลตัน) M3 (5x10^3 ดาลตัน) ไปทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 พบว่าเลแวน M1 M2 และ M3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25-250 μg/mL ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ เมื่อนำเลแวนไปทดสอบการต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ได้รับ LPS พบว่าเลแวนทั้งสามขนาดไม่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบผ่านการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในทางตรงข้าม พบว่าเลแวนทั้งสามขนาดสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในระดับที่แตกต่างกันไป โดย M2 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูงสุด รองลงมาคือ M1 และ M3 ตามลำดับ องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงเลแวนที่มีขนาดเหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์เป็นอาหารเสริมเพื่อช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษากลไกการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ของเลแวนที่เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจว่าเกิดขึ้นผ่าน receptor และวิถีใดเป็นหลัก

ผลผลิต (Output)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ

อยู่ระหว่างการเตรียม Manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

เอกสารอ้างอิง

Aramsangtienchai, P., Kongmon, T., Pechroj, S., and Srisook, K. (2020). Enhanced production and immunomodulatory activity of levan from the acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*. *Int J Biol Macromol, 63*, 574-581.

Belghith, K. S., Dahech, I., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H., and Belghith, H. (2012) Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *Int J Biol Macromol, 50,* 1070-1074.

Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., and Hammes, W. P. (2001) In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis, *Syst Appl Microbiol 24*, 232-237.

Byun, B. Y., Lee, S., and Mah, J. (2014) Antipathogenic activity and preservative effect of levan (β-2,6-fructan), a multifunctional polysaccharide. *Int J Food Sci Technol, 49,* 238-245.

Dogsa, I., Brloznik, M., Stopar, D., and Mandic-Mulec, I. (2013) Exopolymer diversity and the role of levan in Bacillus subtilis biofilms. *PLoS One 8*, e62044.

Dos Santos, L.F., Bazani Cabral De Melo, F.C., Martins Paiva, W.J., Borsato, D., Corradi Custodio Da Silva, M.L., Pedrine Colabone Celligoi, M.A. (2013) Characterization and optimization of levan production by Bacillus subtilis natto. Rom Biotechnol Lett 18, 8413–8422.

Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., and Kim, C. H. (2005) Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis. J Cosmet Sci, 56*, 395-406.

Oner, E. T., Hernandez, L., and Combie, J. (2016) Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol Adv, 34*, 827-844.

Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., and Hsieh, C. Y. (2005) selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J Agric Food Chem, 53*(21), 8211-8215.

Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C. H., Harish, B. S., Janaki Ramaiah, M., and

Uppuluri, K. B. (2015) Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from Acetobacter xylinum NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydr Polym, 123*, 8-16.

Srisook, K., Srisook, E., Nachaiyo, W., Chan-In, M., Thongbai, J., Wongyoo, K., et al. (2015). Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from Clerodendrum inerme leaves. *J Ethnopharmacol 165*, 94-102.

Velázquez-Hernández, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M.P., and Valdez-Alarcón, J.J. (2009) Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J Appl Microbiol 106*(6), 1763-1778.

Visnapuu, T., Mardo, K., and Alamae, T. (2015) Levansucrases of a Pseudomonas syringae pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. N *Biotechnol, 32,* 597-605.

Wu, F. C., Chou, S. Z., Shih, I. L. (2013) Factors affecting the production and molecular weight of levan of Bacillus subtilis natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *J Taiwan Inst Chem Eng* 44, 846–853.

Xu, Q., Yajima, T., Li, W., Saito, K., Ohshima, Y., and Yoshikai, Y. (2006) Levan (beta-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy, 36*(1), 94-101.

Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., and Lee, H. G. (2004) Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int J Biol Macromol 34*, 37-41.

ภาคผนวก

อาหารแข็งชนิด Nutrient Agar (NA) ยี่ห้อ Criterion

Agar	15	กรัมต่อลิตร
Beef Extract	4	กรัมต่อลิตร
Gelatin Peptone	5	กรัมต่อลิตร

อาหารแข็งชนิด Nutrient Agar (NA) ปริมาตร 180 มิลลิลิตร

NB	2.34	กรัม
1.5% Agar	2.70	กรัม
น้ำกลั่น	180	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด Nutrient Broth (NB) ยี่ห้อ Himedia

Yeast extract	1.5	กรัมต่อลิตร
Meat extract B	1.5	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร

อาหารเหลวชนิด Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

NB	0.039	กรัม
น้ำกลั่น	3	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด NB + 10% ซูโครส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

NB	0.13	กรัม
10% ซูโครส	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด NB + 10% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

NB	1.3	กรัม
10% ซูโครส	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSM

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
NaH_2PO_4	3	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	3	กรัมต่อลิตร

อาหารเหลวชนิด BSM + 8% ซูโครส ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.12	มิลลิลิตร
NaH_2PO_4	0.036	กรัม
Na_2HPO_4	0.036	กรัม
8% ซูโครส	0.96	กรัม
น้ำกลั่น	12	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSM + 8% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิลิตร
NaH_2PO_4	0.3	กรัม
Na_2HPO_4	0.3	กรัม
8% ซูโครส	8	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSM + 15% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิลิตร
NaH_2PO_4	0.3	กรัม
Na_2HPO_4	0.3	กรัม
15% ซูโครส	15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSM + 25% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิลิตร
NaH_2PO_4	0.3	กรัม
Na_2HPO_4	0.3	กรัม
25% ซูโครส	25	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSMY

Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร

อาหารเหลวชนิด BSMY + 10% ซูโครส ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

Yeast extract	0.024	กรัม
K_2HPO_4	0.036	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.12	มิลลิลิตร
10% ซูโครส	1.2	กรัม
น้ำกลั่น	12	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSMY + 10% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Yeast extract	0.02	กรัม
K_2HPO_4	0.03	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิลิตร
10% ซูโครส	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSMY + 15% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Yeast extract	0.02	กรัม
K_2HPO_4	0.03	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิลิตร
10% ซูโครส	15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

อาหารเหลวชนิด BSMY + 25% ซูโครส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Yeast extract	0.02	กรัม
K_2HPO_4	0.03	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิลิตร
10% ซูโครส	25	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร