รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ศิวาพร ศิวเวชช. 2535. วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1 . โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสง นครปฐม

ภาษาอังกฤษ

Abbad,A.S.,Talbaoui,H.,Marczak,R. and Bonaly,R. 1995. Isolation and Characterization of Exocellular Polysaccharide Produced by *Bifidobacterium longum*. Apply Microbiology Biotechnology. 43 : 995 -1000.

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method the Quantitation of Microgram Quantities of Proteinn Utilization the Principle of Protein-Binding. Analytical Biochemistry. 72 : 248-254.

Bri gand, G.1993. Scleroglucan . In R.L. Whistler (ed.), Industrial Gums Polysaccharides and their Derivatives, 3 rd ed. Academic Press : California.

Crescenzi, V. 1995. Microcrobial Polysaccharides of Applied Interest; Ongoing Research Activities in Europe. Biotechnology Progress. 1 : 251-259

Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. and Landon, M. 1986. Isolation and Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus* Biotechnology Letter. 8 : 625-628.

Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. and Landon, M. 1988. Exocellular Polysacharide Production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnology Letter. 10 : 255-260.

Cerning J. 1990. Exocellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Review . 97 :113-130.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M.J. 1990. Comparison of Exocellular Polysaccharide Production by Thermophilic Lactic Acid Bacteria. Sciences des Aliments. 10 : 443-451.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M. 1992. Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. J.Dairy Sci. 75 : 692-699.

Cowan, S.T., Halt, J.G., Liston, J., Murray, R., Nivan, C., F.,Rawin, A.W. and Stanier, R.Y. 1970. Burgey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol.2 . Williams and Wilkin : Bultimore.

Dubios, M., Gilles, K.A., Hamitton, J.K., Rebens P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 28 : 350-356.

De man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J.Appl. Bacteriol. 23 : 130-135.

Garcia-Garibay, M.and Marshall, V.M.E. 1991. Polymer Production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J.Appl.Bacteriol. 70: 325-328.

Glicksman M. 1979. Gelling Hydrocolloids in Food Product Applications. In J.M.V. Blanshard and J.R.Mitchell. (eds) , Polysaccherides in Food . Butterworth : London.

Grobben, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R. and De Bont , J.A.M. 1995. Production of Extracellular Polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp, *bulgaricus* NCFB 2772 Grown in a Chemically Defined Medium. J. Appli Bacteriology. 79 : 103-107.

Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. 1992. The Genus leuconostoc. In A.Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W.Harder, K.W. Schleifer (eds.) , the Prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications . Spinger-Verlag : New York

Kang, K.S. and Pettitt, D.J. 1993. Xanthan , Gellan, Welan and Rhamsan. In R.L.. Whistler (ed.) Industrial Gums Polysaccharides and Their Derivatives, 3 rd ed. Academic Press : California.

Kojic, M., Vojcic, M., banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. and Topisirovic, L. 1992. Analysis of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG 11, Isolated from Cheese. Appl. and Env. Microb. 58 : 4056-4088.

Kinery, J.S., Lee, J.B. and Mohoney, V.C. 1969. Improvenments in the Dextran Assay of Cane Sugar Material. Inter Sugar J. 71 : 230-233.

Lee, B.H. 1993. Fundamentals of Food Biotechnology. In Y.H. Hui. (ed.), Food Sci and Technol . VCH Publisher : New York.

Leon-Barrios, M., Gutierrez-Navarro, A.M., Perez-Galdona, diaz-siverio, J., Trujillo, J. and Corzo, J. 1992. Acidic Polysaccharide from Bradyrhizobium *(Chamecytisus proliferus)*. J.of Appli Bacteriol. 72 : 91-96.

Linton, J.D., Ash, S.G. and Huybrechts.1991. Microbial Polysaccharides. In D. Byrom (ed.) , Biomaterials : Novel Materials from Biological Sources. Stockton Press : New york.

Lonvaud-Funel, A. and Jojeux, A.1988. Une Alteration Bacterienne Des Vins : La Maladie Des Vins Filants. Sci. Alim. 8 : 33-49

Macura, D. and Townsley, P.M. 1984. Scandinavian Ropy Milk - identification and Characterization of Endogenous Ropy Lactic Streptococci and Their Extracellular Excretion. J. Dairy Sci. 67 : 735-744.

McNeil, B. and Harvey, M.L. 1993. Viscous Fermentation Products. Viscous fermentation Products. CRC in Biotechnology. 13 (4) : 275-304.

Manca de Nadra M.C. and Strasser de Saad A.M.1995. Polysaccharide Production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. International Journal of Food Microbiology 27 : 101-106.

Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. 1985. Extracellular Polysaccharide Production *by Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. Milchwissenschaft . 40 : 409-411.

Margaritis, A. and Pace., P.W. 1985. Microbial Polysaccharide, In M. Moo Young. (ed.), Comprehensive Biotechnology, 1 st ed.,vol.3. Pergamon Press : New York.

Mitchell J.R.1979. Rheology of Polyssaccharide Solution and Gel. In J.M.V. Blanshard and J.R.Mitchell . Polysaccherides in Food . Butterworth : London.

Moshe R. 1987. Pediococci and Biotechnology. CRC Critical Reviews in Microbiology. 14 (4) : 291-309.

Neve H., Geis A. and Teuber M. 1988. Plasmid-Encoded Functions of Ropy Lactic Acid Streptococcal Srains from Scandinavian Fermented Milk. Biochimie. 70:437-442.

Pace, G.W. 1980. Rheology of Mycelial Fermentation Broths. In J.E.Smith, D.R. Berry and B.Kristiansen. (eds.) , Fungal Biotechnol . Academic : New York.

Pace, G.W. and Righelato R.C. 1980. Production of Extracellular Microbial Polysaccharides. Adv. Biochem. Eng. 15 : 41-70.

Pidoux, m., Brillouet, J.M. and Quemener, B. 1988. Characterization of the Polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from Sugary Kefir Grains. Biotechnol Lett. 10 : 415-420.

Pual A.S. 1979. A Survey of Possible New Polysaccharides. In J.M.V. Blanshard and J.R. Mitchell. (eds.) , Polysaccherides in Food . Butterworth : London.

Roberts, C.M., Fett, W.F., Osman, S.F., Wijey, C., O'Connor, J.V. and Hoover, D.G. 1995. Exopolysaccharide Production by *Bifidobacterium longum* BB-79. J.Appl.Bacteriol. 78 : 463-468.

Sutherland, I.W. 1979. Enhancement of Polysacchride Viscosity of Mutagenesis J.Appl.Biochem. 1 : 60-70.

Sutherland, I.W. 1982. Biosynthesis of Microbial Polysaccharides. Adv. Microb. Physiol. 33 : 78-150

Sutherland, I.W. 1993. Biosynthesis of Extracellular Polysaccharides (Exopolysaccharides) In R.L. Whistler (ed.) Industrial Gums Polysaccharides and Their Derivatives, 3 rd ed.Academic Press : California.

Whistler, R.L. and Be Miller (1993) Introduction to Polysaccharides. In R.L. Whistler (ed.), Industrial Gums Polysaccharides and Their Derivatives, 3 rd ed. Academic Press : California.

Weiss N. 1992. The Genera Pediococcus and Aerococcus . In A.Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W.Harder, K.W. Schleifer. the Prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Spinger-Verlag : New York.

Williamson, D.H. 1959. Studies on Lactobacilli Cansing Ropiness in Beer. J.App.Bacteriol. 22:392-402.

Whiting, G.C. 1975. Some Biochemical and Flavour Aspects of Lactic Acid Bacteria in Ciders and Alcoholic Beverages. In G.Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds.), Lactic Acid bacteria in Beverages and Food . Academic Press : London .

Ueda, S., Fumiko, M., Osajima, K. and Ito, K. 1981. Extracellular Polysaccharide Produced by strain No.626 of *Aeromonas hydrophila*. Agric.Biol.chem. 45(9) : 1977-1981

Urlacher B. and Dalbe B. Xanthan gum. In A. Imeson . (ed), Thickening and Gelling Agents for Food . Chapman and Hall : United Kingdom.

Van den Berg, D.J.C., Robijn, G.W., janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling,J.P., Vliegenthart, j.F.G., ledeboer, A.M. and Verrips, C.T. 1995. Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 2840-2844.

Vedamuthu, E.R. and Neville, J.M. 1986. Involvenent of a Plasmid in Production of Ropiness (Mucoidness) in Milk Cultures by *Streptococcus cremoris* MS. Appl. Environ. Microbiol. 51 : 677-682.

ภาคผนวก ก.

1. <u>การย้อมสีแกรม (Hucker modification)</u>

1.1 <u>Ammonium oxalate crystal violet</u>

solution A : Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol	20.0	มิลลิลิตร
solution B : Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80.0	มิลลิลิตร

1.2 <u>Lugol's solution</u>

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

1.3 <u>Counterstain solution</u>

• Safranin O	10.0	มิลลิลิตร
(2.5 % solution in 95 % ethanol)		
Distilled water	100	มิลลิลิตร

<u>วิธีการย้อม</u>

นำสไลด์ที่ Smear เชื้อมาทำให้แห้งและ Fix โดยผ่านไอความร้อนของตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วย้อมด้วยสารละลาย Ammonium oxalate crystal violet นาน 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำแล้วหยดสารละลาย Lugol's solution ลงไปปล่อยไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง หยด Ethyl alcohol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไป decolorize ซับให้แห้ง แล้วย้อมทับด้วย counterstain solution นาน 10 วินาที แล้วล้างน้ำและทำให้แห้ง นำไปตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อติดสีของ crystal violet แสดงว่าเป็นเชื้อแกรมบวก แต่ถ้าติดสีแดงของ Safranin แสดงว่าเป็นแกรมลบ

2. การเตรียม Hydrogen peroxide solution

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

3. การเตรียม Nitrate broth

Peptone	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
KNO_3	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Nitrate test solution

solution A : Sulphanillic acid	0.8	กรัม
Acetic acid (5 นอร์มัล)	100	มิลลิลิตร

ละลาย Sulphanillic acid ใน acetic acid โดยให้ความร้อนเล็กน้อย

solution B : α - Napthylamine	0.5	กรัม
Acetic acid (5 นอร์มัล)	100	มิลลิลิตร

4. การเตรียม Esculin broth

Esculin	1.0	กรัม
Glucose	0.25	กรัม
Ferric citrate	0.25	กรัม
Beef extract	0.50	กรัม
Yeast extract	0.50	กรัม
$MnSO_4$. H2O	0.01	กรัม
Tween 80	0.10	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การเตรียม Arginine agar

Peptone	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.03	กรัม
L(+) arginine HCl	1.0	กรัม
Phenol	0.001	กรัม
Agar	0.3	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. การเตรียม Fermentable carbohydrate broth

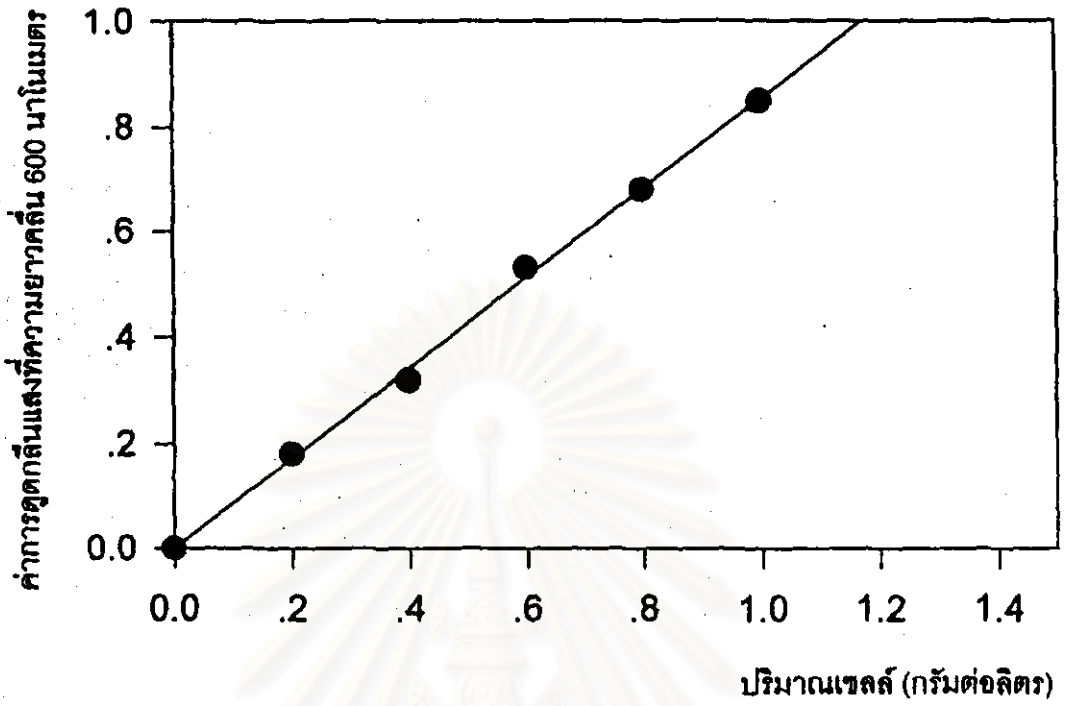
Carbohydrate	0.5	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Salt solution	0.5	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

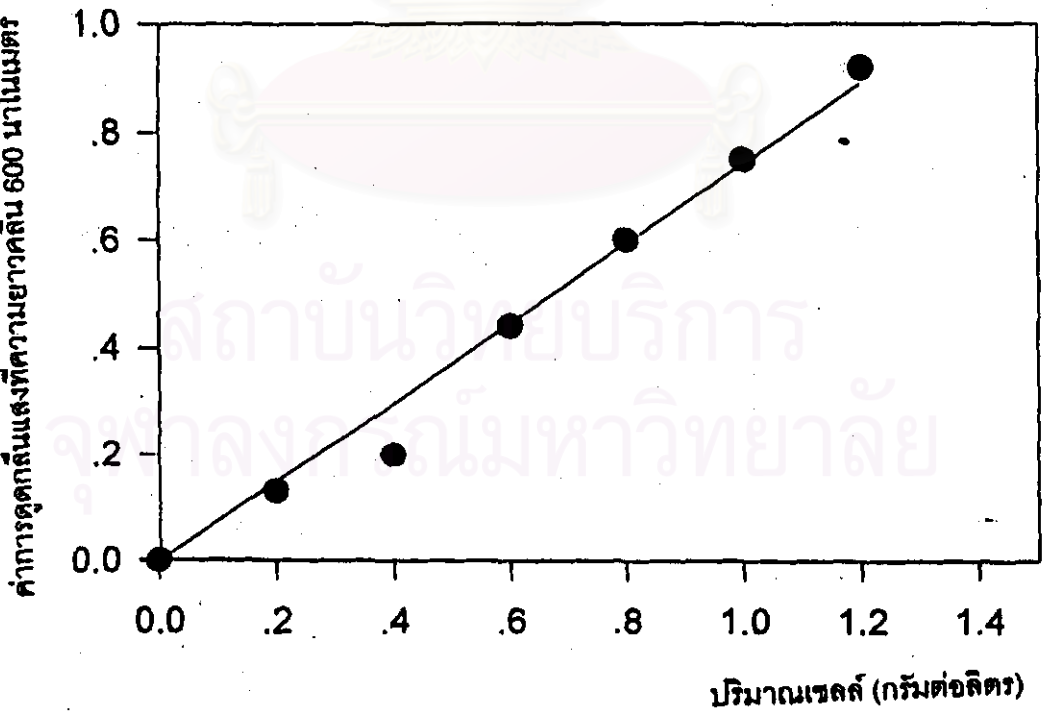
การเตรียม Mixed indicator

Bromthymol blue	0.2	กรัม
Neutral red	0.1	กรัม
Ethanol	300	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ของ AP-1



รูปที่ 27 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ของ AP-3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การหาปริมาณเอกโซพอลีแซคคาไรด์</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Kinery และคณะ, 1969)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน</u>

นำ EPS ที่ผ่านการทำแห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นเจือจางด้วยน้ำกลั่นนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ดังแสดงในรูปที่ 28 และรูปที่29

<u>การวิเคราะห์หาน้ำหนักของ EPS</u>

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบ 48 ชั่วโมง ไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

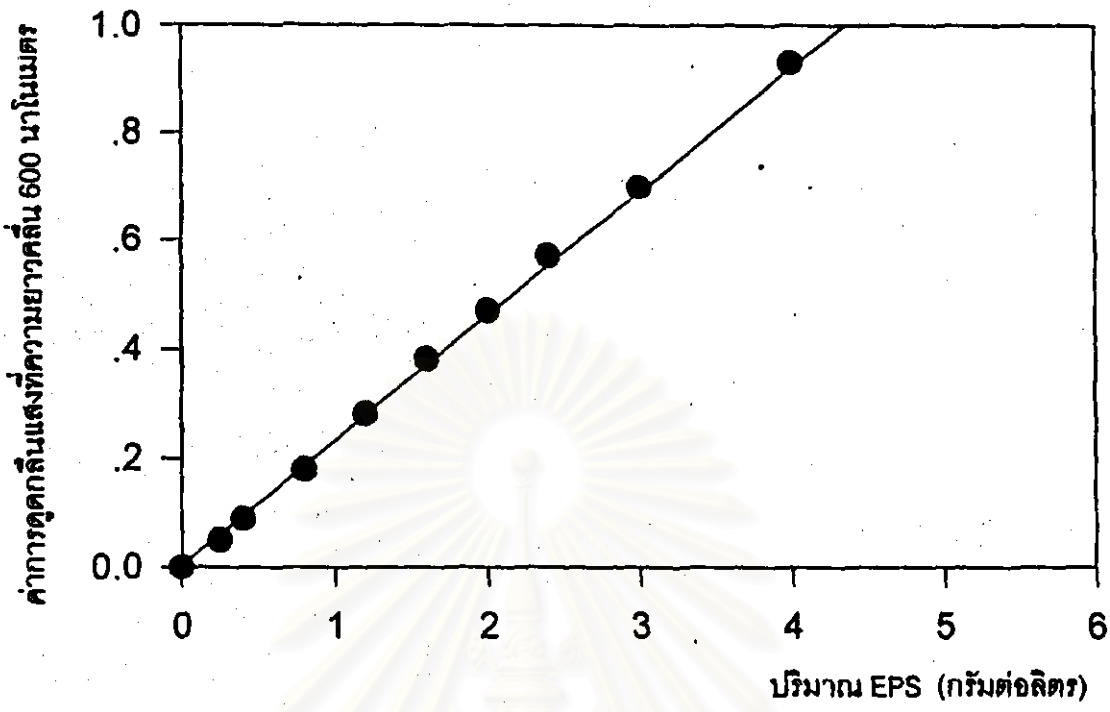
2. นำไปตกตะกอนแยกพอลีแซคคาไรด์ โดยปิเปตสารละลายส่วนใส 1 ส่วน ใส่ลงในหลอดทดลองใช้เอทธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 5 ส่วน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ EPS ตกตะกอน

3. นำมาปั่นแยก EPS ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

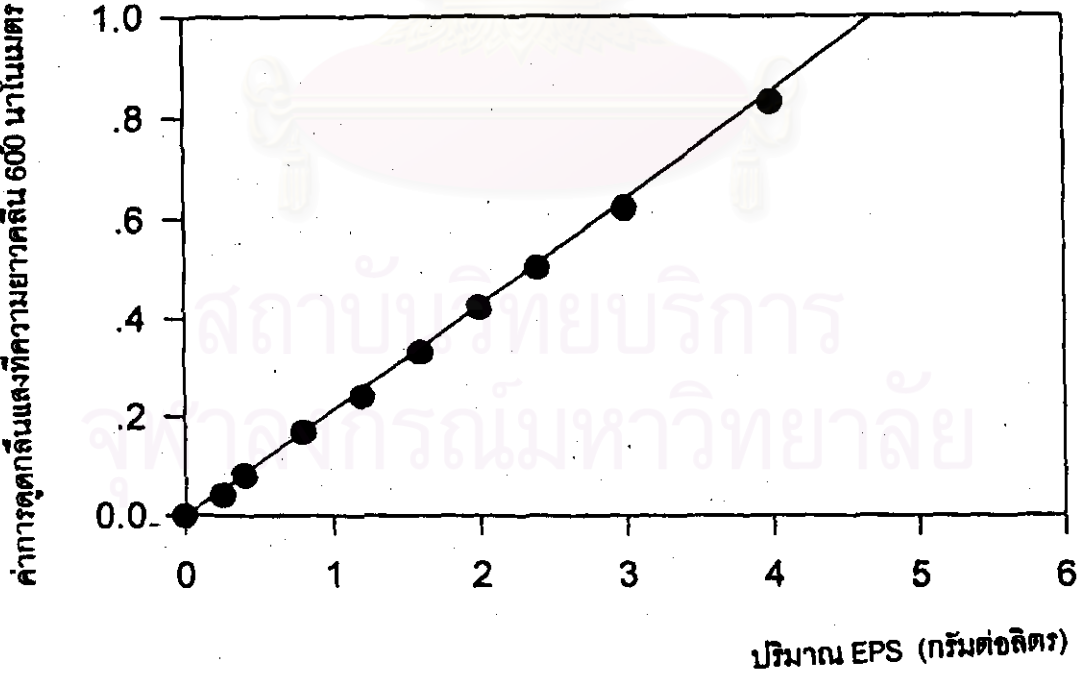
4. ดูดสารละลายส่วนใสออก แล้วนำไประเหยบน water bath จนแห้ง

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใน EPS ที่แยกได้ นำไปคำนวณ แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1



รูปที่ 29 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3

3. การหาค่าความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer

วิธีทำ

1. นำตัวอย่างที่ต้องการวัดค่าความหนืดใส่ลงใน cup วัดความหนืดของเครื่อง (ปริมาตรที่ใส่ขึ้นอยู่กับขนาดของเซ็มวัด เช่น NV 100 ใช้ตัวอย่างปริมาตร 9 มิลลิลิตร)
2. ปรับค่าเปอร์เซ็นต์ shear stress เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์
3. ปรับค่าเปอร์เซ็นต์ shear rate เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์
4. กำหนดช่วงของแรงเฉือน (shear rate) เท่ากับ 10-100 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการทำงาน 10 นาที เป็น 10 ระยะ (step)
5. กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการวัดความหนืดที่ 25 องศาเซลเซียส
6. กด enter เพื่อให้เครื่องทำงาน
7. ป้อนคำสั่งให้เครื่องคอมพิวเตอร์ผลการวัดค่าความหนืดจะพิมพ์ออกมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. <u>การหาน้ำหนักเซลล์</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Van den Berg *et al.*, 1995)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน</u>

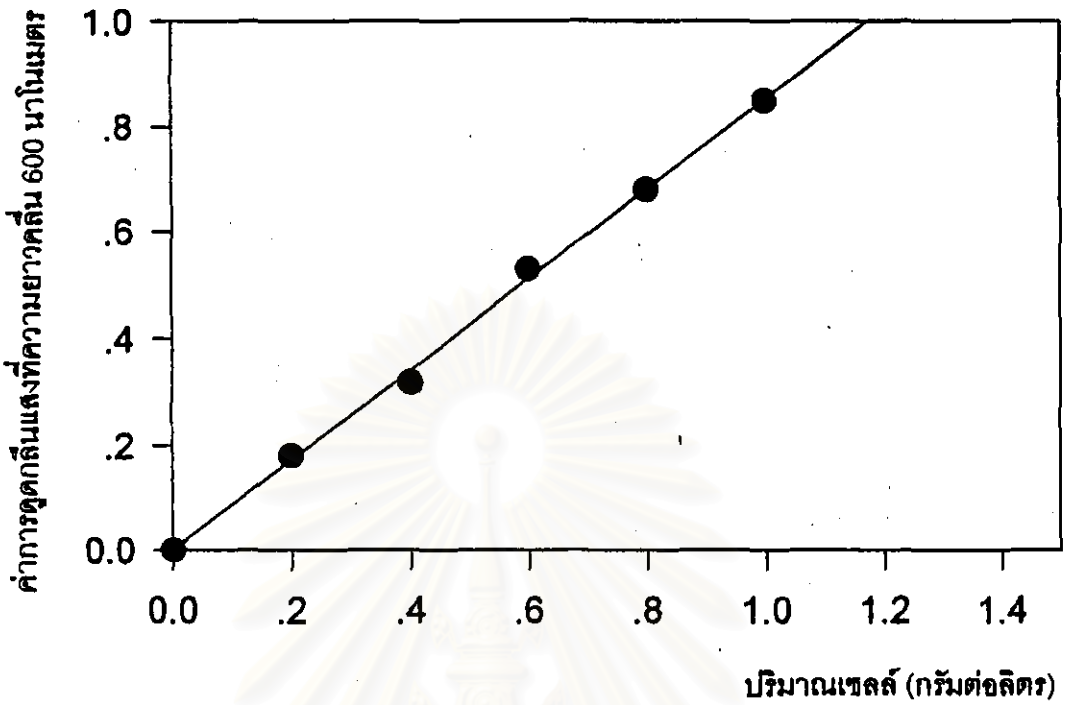
นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มครบ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้ส่วนของเซลล์มาทำการเจือจางได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตั้งแต่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 แล้วจึงนำสารละลายนี้ไปหาน้ำหนักแห้ง โดยปิเปตสารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ กัน เติมลงใน ถ้วย 10 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำใส่ใน Dessicator แล้วชั่งน้ำหนักของถ้วยที่แน่นอน) นำไประเหยน้ำออกบน water bath แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วใส่ใน Dessicator และนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 27-28

<u>การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์</u>

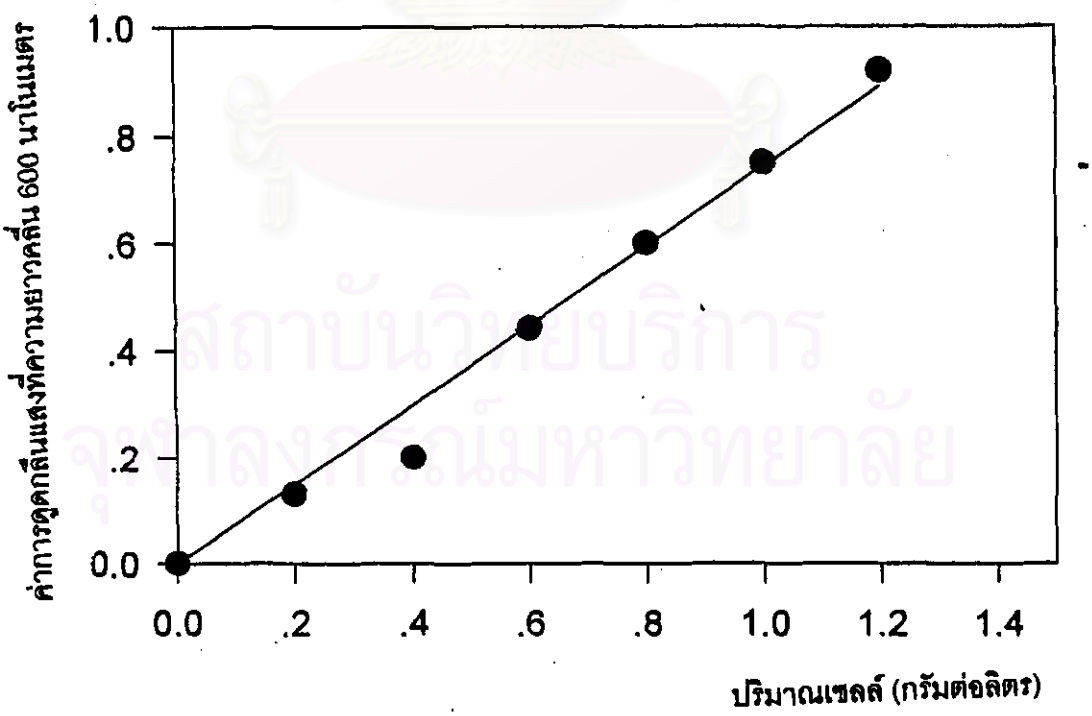
นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบ 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังจากปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว นำไปคำนวณหรือเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์

<u>การคำนวณ</u>

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ = ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ - ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว



รูปที่ 27 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ของ AP-1



รูปที่ 28 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ของ AP-3

2. <u>การหาปริมาณเอกโซพอลิแซคคาไรด์</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Kinery และคณะ, 1969)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน</u>

นำ EPS ที่ผ่านการทำแห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นเจือจางด้วยน้ำกลั่นนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ดังแสดงในรูปที่ 29 และรูปที่ 30

<u>การวิเคราะห์หาน้ำหนักของ EPS</u>

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบ 48 ชั่วโมง ไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

2. นำไปตกตะกอนแยกพอลีแซคคาไรด์ โดยบีเปตสารละลายส่วนใส 1 ส่วน ใส่ลงในหลอดทดลองใช้เอทธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 5 ส่วน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ EPS ตกตะกอน

3. นำมาปั่นแยก EPS ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

4. ดูดสารละลายส่วนใสออก แล้วนำไประเหยบน water bath จนแห้ง

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใน EPS ที่แยกได้ นำไปคำนวณ แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การหาปริมาณเอกโซพอลีแซคคาไรด์</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Kinery และคณะ, 1969)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน</u>

นำ EPS ที่ผ่านการทำแห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นเจือจางด้วยน้ำกลั่นนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ดังแสดงในรูปที่ 29 และรูปที่ 30

<u>การวิเคราะห์หาน้ำหนักของ EPS</u>

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบ 48 ชั่วโมง ไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

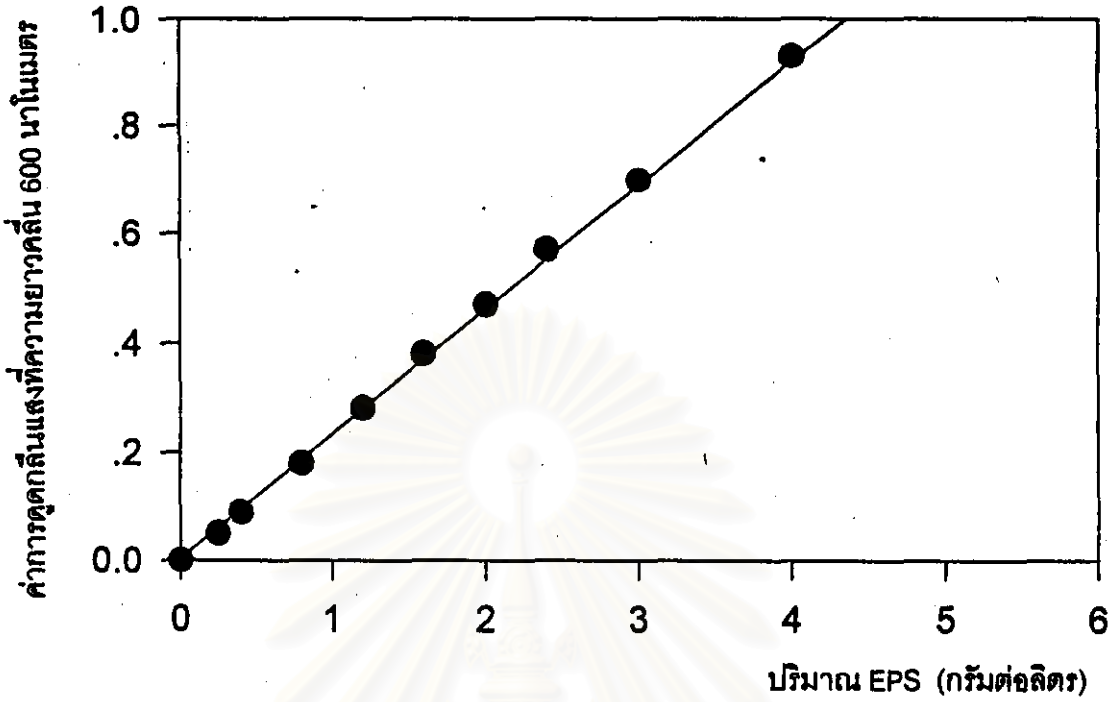
2. นำไปตกตะกอนแยกพอลีแซคคาไรด์ โดยปิเปตสารละลายส่วนใส 1 ส่วน ใส่ลงในหลอดทดลองใช้เอทธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 5 ส่วน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ EPS ตกตะกอน

3. นำมาปั่นแยก EPS ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

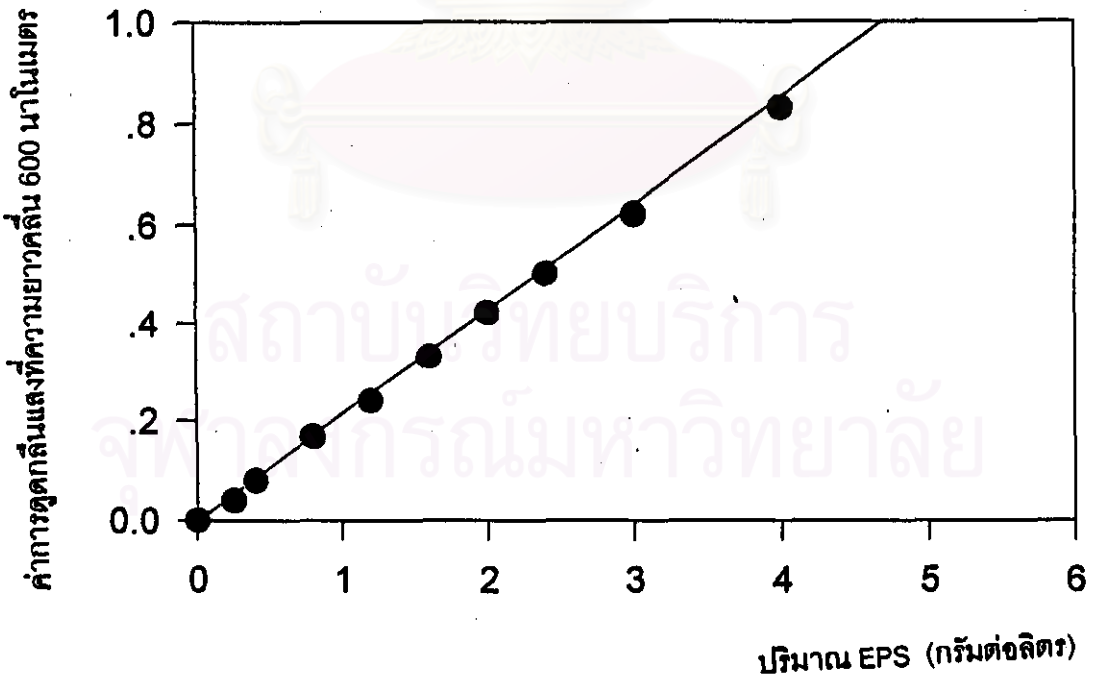
4. ดูดสารละลายส่วนใสออก แล้วนำไประเหยบน water bath จนแห้ง

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใน EPS ที่แยกได้ นำไปคำนวณ แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1

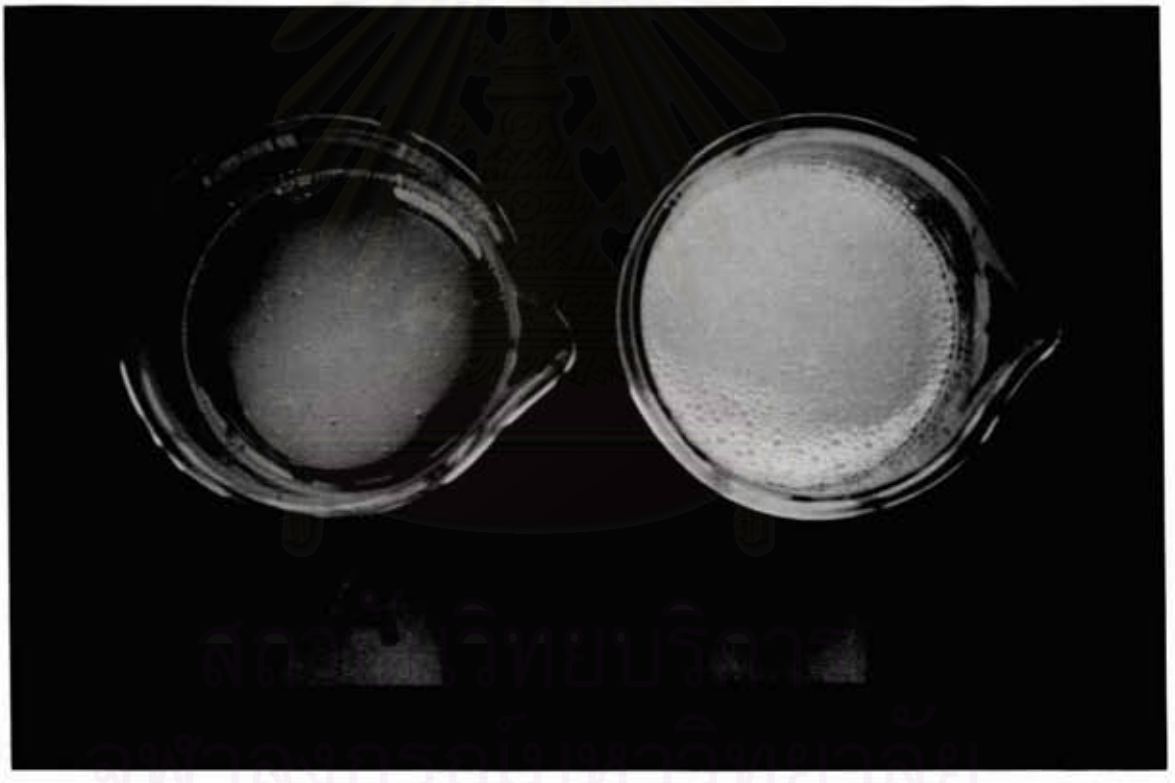


รูปที่ 30 แสดงกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3

ภาคผนวก ค.

1. **<u>ชนิดประจุของพอลีแซคคาไรด์</u>** (Ueda *et al.*, 1981)

นำ EPS ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล เติมสารละลาย Cetylpyridinium Chloride;CPC ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (2 มิลลิกรัม ของ EPS ต่อ 2-3 มิลลิลิตร ของ CPC) บ่มที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลีแซคคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharides) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมา ทดสอบว่าเป็นพอลีแซคคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharides) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดตะกอน EPS ขึ้นอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 31



(A) (B)

<u>รูปที่</u> 31 แสดงการทดสอบชนิดประจุของ EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ Xanthan gum (A) และที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 (B)

2. การทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของ EPS (ดัดแปลงจากวิธีของ Leon-Barrios และคณะ, 1992)

นำ EPS 20 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ปิดแน่น จุ่มลงในน้ำเดือดนาน 7 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทำให้เย็นและทำให้เป็นกลางโดยใช้ NaOH นำสารละลายส่วนใสที่ได้เก็บไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex Spherisorb-NH_2 ขนาด 25 cm.x 4.6 mm. มีภาคนำพา (Mobile phase) เป็นอะซิโตไนไตรท์ (Acetonitrile) และน้ำ ด้วยอัตราส่วน 90 : 10 อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลโดยใช้ Refractive index detector ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้ผลแสดงดังรูปที่ 32-34

C-R1A
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 4406
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		4.1	51.7074		88669
0		4.56	48.2925	V	82813
	TOTAL		99.9999		171483

รูปที่ 32 แสดงโครมาโตรแกรมของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

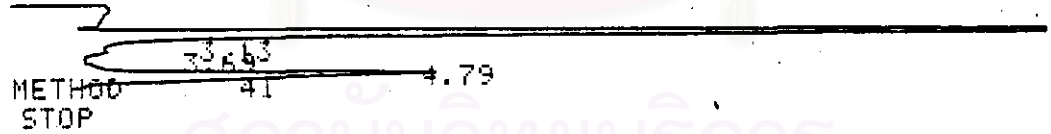
```
START  06.03.14.21.

                                                          4.59
STOP

C-R1A
SMPL #       00
FILE #        1
REPT #     4401
METHOD       41

     #    NAME    TIME          CONC      MK        AREA
     0            4.11          1.1215                15853
     0            4.59         98.8784    V        1397698
            TOTAL               99.9999               1413552
```

รูปที่ 33 แสดงโครมาโตรแกรมของเอกโซพอลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



```
START  06.03.15.40.

METHOD       41          4.79
 STOP

C-R1A
SMPL #       00
FILE #        1
REPT #     4408
METHOD       41

     #    NAME    TIME          CONC      MK        AREA
     0            4.79         99.9999    V         184532
            TOTAL               99.9999               184532
```

รูปที่ 34 แสดงโครมาโตรแกรมของเอกโซพอลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

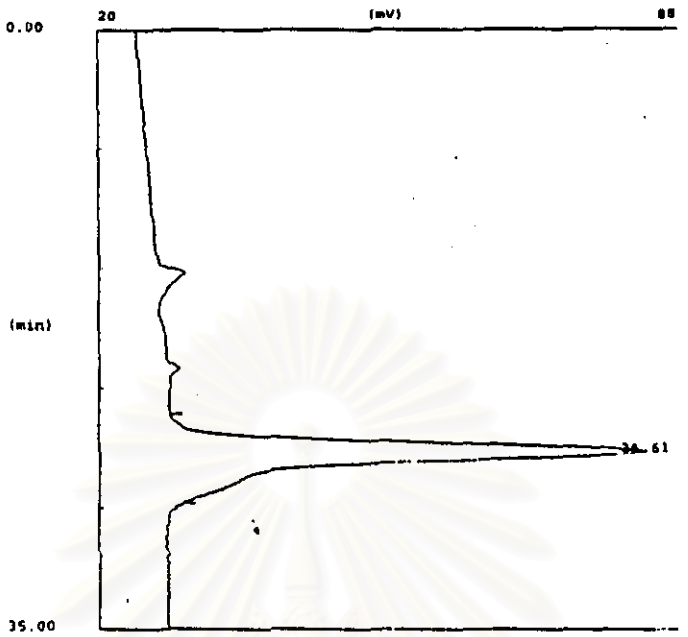
3. <u>การทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของ EPS</u>

นำ EPS ที่ละลายในน้ำกลั่นจนหมดไปฉีดเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง High performance size exclusion chromatography โดยใช้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ของสารตัวอย่าง โดยมีการใช้คอลัมน์ชนิด Altra hydrogel HPSEC columns ขนาด 7.8 mm. X 30 cm มีภาคนำพา (Mobile phase) เป็น Deionized water อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยใช้ Detector 3 เครื่อง คือ Altra hydrogel 120 จำนวน 2 เครื่อง และ Altra hydrogel linear 1 เครื่อง ดังแสดงผลดังรูปที่ 35 และ 36 และการวิเคราะห์ผลดังตารางที่ 25

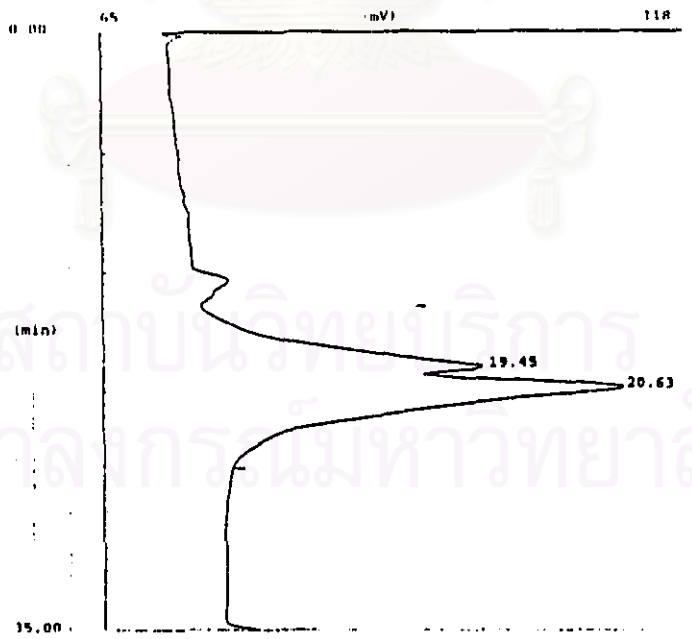
<u>ตารางที่</u> 25 แสดงผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ AP-1 และ AP-3

EPS ที่ผลิตโดย	Retention time (นาที)	Log MW	Molecular weight	Degree of polymerization
AP-1	24.61	4.224	16747	103.4
AP-3	19.45	7.567	$4x10^7$	$2x10^5$
AP-3	20.63	6.802	$6x10^6$	39149

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 แสดงโครมาโตรแกรมของเอกโซพอลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC



รูปที่ 36 แสดงโครมาโตรแกรมของเอกโซพอลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC

4. <u>การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของ EPS</u> (Dubios *et al.*, 1956)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

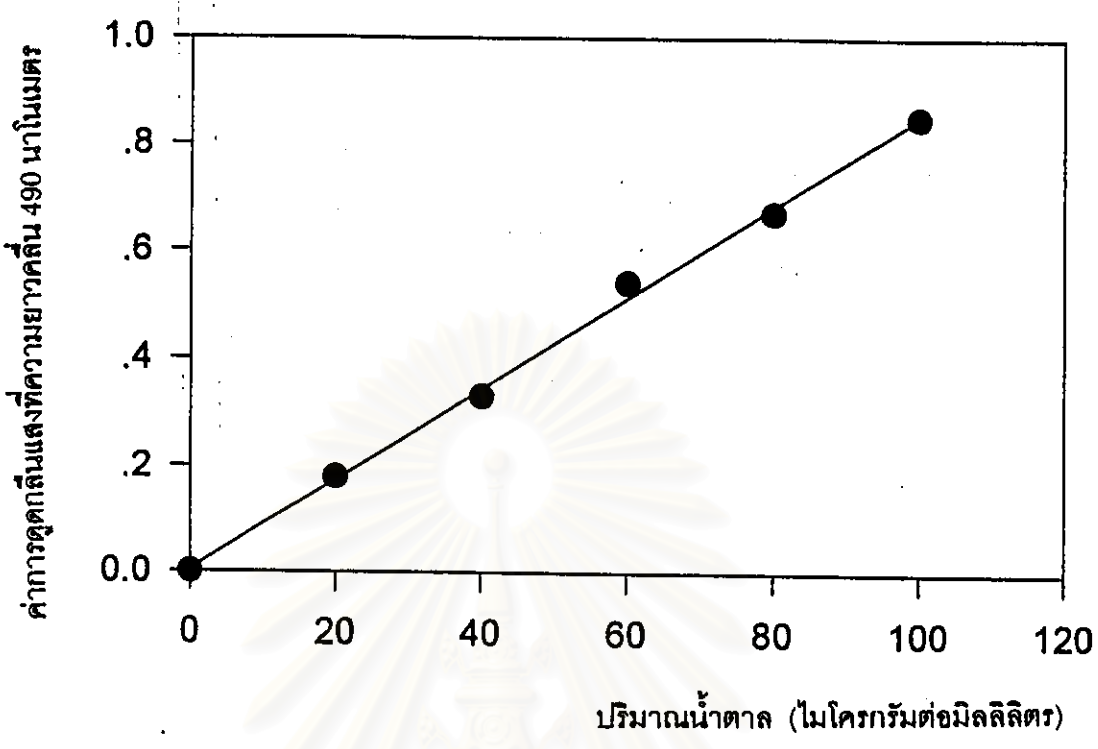
<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ปิเปตสารละลาย EPS ที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมข้อที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรง ๆ ผสมให้เข้ากัน
4. ตั้งทิ้งไว้อีก 20 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

<u>การทำกราฟมาตรฐาน</u>

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
2. เจือจางให้ได้ 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. นำไปทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 . กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

5. <u>การทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ EPS</u> (Bradford, 1976)

<u>สารเคมี</u>

1. <u>การเตรียมสารละลาย Coomassie blue</u>

โดยการชั่ง Coomassie blue G250 100 มิลลิกรัม ละลายใน เอทธานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วจึงเติมกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2. <u>การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA</u> (Bovine serum albumin)

โดยการชั่ง BSA 0.25 กรัม ละลายในน้ำปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 25 มิลลิลิตร ได้ สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์

3. การทำกราฟมาตรฐาน

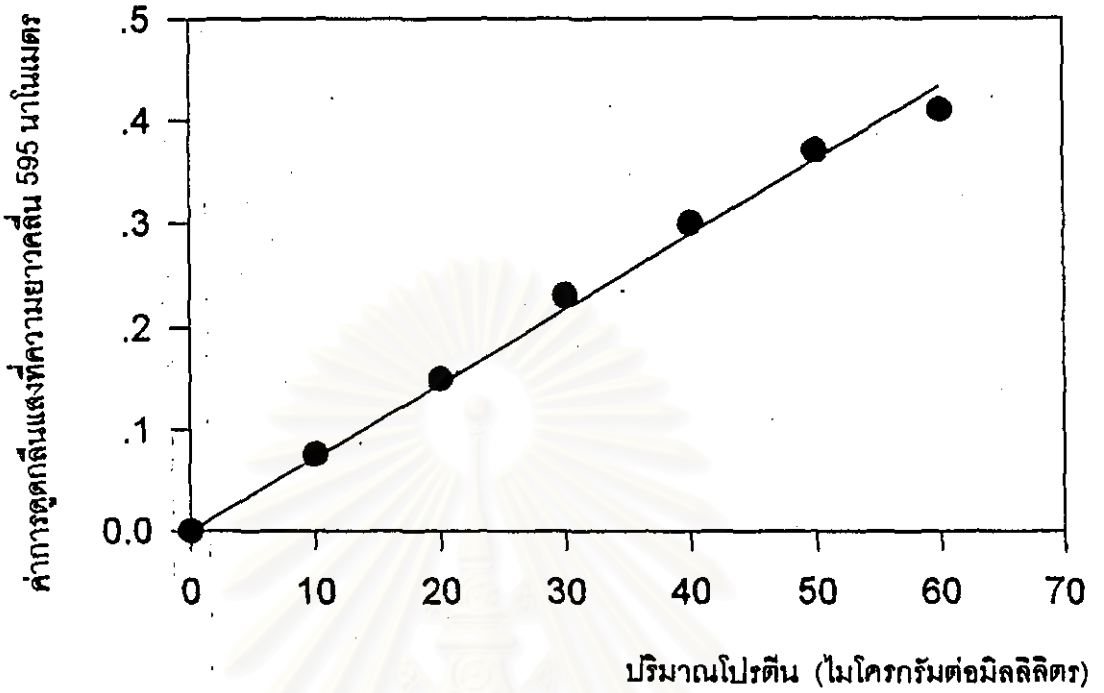
ปิเปตสารละลายมาตรฐาน BSA 0.04 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในของเหลวปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 26 เติมน้ำจนได้สารละลายโปรตีน 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie blue 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำมาเขียนกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีนทั้งหมดดังรูปที่ 38

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie blue 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 26 แสดงการเตรียมสารละลาย 0.04 % BSA เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

ปริมาณโปรตีน (µg)	ปริมาตร 0.04%BSA (µl)	ปริมาตรน้ำกลั่น (µl)	ปริมาณ Coomassie blue (ml)
0	-	200	10
10	25	175	10
20	50	150	10
30	75	125	10
40	100	100	10
50	125	75	10
60	150	50	10
70	175	25	10
80	200	-	10



รูปที่ 38 กราฟมาตรฐาน BSA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจันทร์จนา ตันสกุล เกิดวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ. 2513 ที่อำเภอเมือง ฯ จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2535 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย