



รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การผลิต Exopolysaccharides โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

โดย

ศุวิมล กীরติพิบูล
สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์
ฐิตาภา เขียวขจี

พฤศจิกายน 2540

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การผลิต Exopolysaccharides โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

โดย

ดร.สุวิมล กิรติพิบูล

ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

ดร.จิตาภา เขียวขจี

พฤศจิกายน 2540

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชเพื่อใช้ในการวิจัยรวมทั้งได้รับความร่วมมืออย่างดียิ่งจากฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในด้านการประสานงานต่าง ๆ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลีปัทม์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ทำงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุนีย์ โชตินิรนาท หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้งสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC ขอขอบคุณ คุณสุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง เจ้าหน้าที่แห่งศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC และให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ค่าความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer ขอขอบคุณ คุณวาทินี ปรีชาจารย์ บริษัท System Bio-industrials Ltd. ที่ให้ความอนุเคราะห์ Xanthan gum (SATIAXANE[®]) เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติด้านความหนืดรวมทั้งให้คำแนะนำเกี่ยวกับสารไฮโดรคอลลอยด์ และสุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุก ๆ ท่านของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกมาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่

เลขทะเบียน 010571

วัน เดือน ปี 18 มิ.ย. 44

ชื่อโครงการวิจัย การผลิต Exopolysaccharides โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก
 และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล ,
 รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ ดร.ฐิตาภา เขียวขจี

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2540

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองจำนวน 97 เชื้อ และจากน้ำอ้อยจำนวน 28 เชื้อ โดยนำมาทดสอบความสามารถในการผลิต Exopolysaccharides (EPS) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็งและเหลวที่แปรชนิดของน้ำตาลคือ ซูโครส แลคโตส กลูโคส และฟรุคโตส พบว่าเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถสร้าง EPS ได้สูงสุดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน การสร้าง EPS นั้นสัมพันธ์กับการเจริญ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่า AP-1 และ AP-3 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Pediococcus pentosaceus* ส่วน LE13-1 และ LE13-2 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อศึกษาหาสูตรและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่าเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ผลิต EPS ได้น้ำหนัก EPS ต่อกรัม ซูโครสสูง เมื่อใช้อาหารที่ดัดแปลงสูตรโดยประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 4, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วย Yeast extract เท่ากับ 0.5, 0.5, 0.25 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ , Peptone 1.5, 1.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, Beef extract 1.0, 1.5, 1.0 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบบไม่เขย่า ในภาวะที่เหมาะสมนี้ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถผลิต EPS ได้เท่ากับ 16.32 , 18.56, 9.32 และ 6.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลาย EPS ของเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ไปทดสอบคุณสมบัติด้านความหนืด พบว่า มีลักษณะเป็นแบบ Pseudoplastic โดยให้คุณสมบัติ Shear thinning เมื่อ Shear rate สูงขึ้นความหนืดจะลดลง อย่างไรก็ตามความหนืดของสารละลายไม่คงตัวต่ออุณหภูมิและ pH ต่ำหรือสูงเกินไป และยังพบว่าเมื่อละลาย EPS ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl และ KCl ตั้งแต่ 1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จะมีผลทำให้ความหนืดของสารละลายสูงขึ้น แต่ EPS ที่ผลิตได้จาก AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 จะไม่ละลายน้ำ เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการจำแนกชนิดของประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ตามลักษณะประจุไฟฟ้าและชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบพบว่า EPS จากทั้ง AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีประจุเป็นกลางและมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 90.25, 85.20, 96.64 และ 95.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1, 0.4, 0.285 และ 0.178 ตามลำดับ EPS ที่ได้จากทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีคุณสมบัติในการเป็น Stabilizer และ Emulsifier

Project Title Exopolysaccharides Production by Lactic Acid bacteria
and Its Application in Food Products

Name of the Investigators Assist.Prof. Dr. Suwimon Keeratipibul,
Assoc.Prof.Dr. Somboon Tanasupawat and Dr. Thitapha Khieokhachee

Year September 1997

Abstract

Ninety seven strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented foods and twenty eight strains from sugar cane juice in Thailand were screened for exopolysaccharides (EPS) production on MRS agar and in MRS broth using different sugars; sucrose, lactose, glucose and fructose. The strains AP-1, AP-3, LE13-1 and LE13-2 were found to produce a large amount of EPS from sucrose and their productions were associated with growth. On the basis of morphological, cultural, physiological and biochemical tests, AP-1 and AP-3 strains were identified as *Pediococcus pentosaceus*, and LE13-1 and LE13-2 strains as *Leuconostoc mesenteroides*. The highest EPS production of these four strains were obtained when grown at 30°C without aeration using broth containing; sucrose 4, 10, 8 and 6 % , yeast extract 0.5, 0.5, 0.25 and 2.0 % , peptone 1.0, 1.5, 1.0 and 1.0 % , beef extract 1.0, 1.5, 1.0 and 1.0 % , respectively. Under this optimum condition, AP-1, AP-3, LE13-1 and LE13-2 strains could produce 16.32, 18.56, 9.32 and 6.35 g/l, respectively.

Polysaccharides from AP-1, AP-3, LE13-1 and LE13-2 strains showed pseudoplastic (shear thinning) properties. However, the viscosity of all polysaccharides was not resistant to high temperature or low pH, but it was increased in presence of NaCl or KCl at concentration higher than 1 % . The EPS became insoluble in water when the concentration of KCl was increased to 8 % and 10 % . Partially purified EPS produced by AP-1, AP-3, LE13-1 and LE13-2 strains were shown to be neutral polysaccharides consisting predominately of glucose. They are composed of 90.25, 85.20, 96.64 and 95.32 % sugar and 0.1, 0.4, 0.285 and 0.178 protein, respectively. EPS from all four strains did not show stabilizing or emulsifying activity under conditions tested.

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการรูปประกอบ	viii
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วิธีการวิจัย	8
4 ผลการวิจัย	22
5 การอภิปรายผล	90
6 ข้อเสนอ	103
7 ข้อเสนอแนะ	105
บรรณานุกรม	106
ภาคผนวก ก.	111
ภาคผนวก ข.	114
ภาคผนวก ค.	117

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	แบคทีเรียแลคติกที่ได้จากอาหารหมักดองและน้ำอ้อย	23
2	ลักษณะของกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ใหม่	25
3	แบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาแบ่งกลุ่มตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี	28
4	แสดงผลการสร้าง EPS บนอาหารวุ้น MRS ที่แปรชนิดของน้ำตาล ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง	30
5	แสดงผลการสร้าง EPS บนอาหารวุ้น MRS ที่แปรชนิดของน้ำตาล ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย	31
6	แสดงผลการสร้าง EPS ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ	34
7	ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. ที่สร้าง EPS	35
8	การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. ที่สร้าง EPS	36
9	ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i>	38
10	การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i>	40
11	ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	42
12	การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	45
13	แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ AP-1 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง	54
14	แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ AP-3 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง	55
15	แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ LE13-1 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง	56
16	แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ LE13-2 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง	57

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-1	63
18	แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-3	64
19	แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-1	65
20	แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-2	66
21	แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP 1	67
22	แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-3	67
23	แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-1	68
24	แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-2	68
25	แสดงคุณสมบัติและองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้	71
26	แสดงลักษณะของการทดสอบความสามารถในการเป็น Emulsifier ของ EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2	87
27	แสดงผลของปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์เมื่อผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน	88
28	แสดงการจำแนกเชื้อสกุล <i>Pediococcus</i> sp.	92
29	แสดงความแตกต่างของเชื้อกลุ่ม <i>Leuconostoc</i> sp.	94
30	แสดงผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ AP-1 และ AP-3	119
31	แสดงการเตรียมสารละลาย 0.04 % BSA เพื่อทำกราฟมาตรฐาน	123

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ AP-1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 % เป็นองค์ประกอบ	32
2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ AP-3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 % เป็นองค์ประกอบ	32
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ LE13-1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 % เป็นองค์ประกอบ	33
4	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ LE13-2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 % เป็นองค์ประกอบ	33
5	กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ AP-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
6	กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ AP-3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	50
7	กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ LE13-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	51
8	กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ LE13-2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	52
9	กราฟแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-1	59

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10	กราฟแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-3	60
11	กราฟแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-1	61
12	กราฟแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-2	62
13	แสดงลักษณะ EPS ของ AP-1 ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer	69
14	แสดงลักษณะ EPS ของ AP-3 ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer	69
15	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-7.0 เปอร์เซ็นต์	73
16	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-7.0 เปอร์เซ็นต์	73
17	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-7.0 เปอร์เซ็นต์	74
18	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-7.0 เปอร์เซ็นต์	74
19	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน	76
20	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน	76
21	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน	77
22	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน	77

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
23	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl	78
24	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl	78
25	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl	79
26	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl	79
27	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ	80
28	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ	80
29	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ	81
30	แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ	81
31	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	83
32	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	83

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
33	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	84
34	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	84
35	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	85
36	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	85
37	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	86
38	แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์	86
39	แสดงการทดสอบชนิดประจุเมื่อมีประจุแบบ Acidic polysaccharides (A) และ Neutral Polysaccharides (B)	116
40	แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	117
41	แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	118

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
42	แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	119
43	แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	120
44	แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC	121
45	แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC	121

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

Polysaccharides คือ สารจำพวกคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกเป็นสายยาว อาจจะมีกิ่งก้านสาขาหรือไม่มี โดยมากจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง Polysaccharides ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะเป็นชนิดละลายน้ำได้ และมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรคอลลอยด์ สามารถดูดน้ำได้ดี เมื่อละลายในของเหลวจะทำให้ของเหลวมีความข้นหนืดมากขึ้น ในอุตสาหกรรมอาหารจึงมีการนำสารจำพวก Polysaccharides นี้ไปใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดในผลิตภัณฑ์ เช่น ในอาหารประเภทซूप ซอส ฯลฯ

การเลือกใช้ Polysaccharides ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างไรก็ดี พบว่ายังไม่มี Polysaccharides ชนิดใดที่มีคุณสมบัติครบทุกประการและสามารถใช้ได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทุกประเภท และบางครั้งต้องนำ Polysaccharides มากกว่า 1 ชนิดมาผสมกันเพื่อให้ได้คุณสมบัติที่ต้องการ Polysaccharides แต่ละชนิดมีราคาแตกต่างกันบางชนิดมีคุณสมบัติดี แต่อาจมีราคาแพงมากเพราะแหล่งที่ใช้ผลิตอาจจะผลิต Polysaccharides ได้ในจำนวนน้อย หรือมีต้นทุนในการผลิตสูง

ในปัจจุบันมี Polysaccharides หลายชนิดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด มีทั้งผลิตโดย พืช สาหร่าย หรือแบคทีเรีย Polysaccharides ที่ได้จากพืช ได้แก่ Guar gum, Locust bean gum, Tragacanth เป็นต้น สาหร่ายสามารถผลิต Alginate, Agar และ Carrageenan โดยมี Polysaccharides ที่ได้จากแบคทีเรียมีหลายชนิด แต่ที่มีสัดส่วนในการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด ได้แก่ Xanthan gum ซึ่งได้จากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* การผลิต Polysaccharides จากเชื้อแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมคุณภาพของ Polysaccharides ได้โดยควบคุมสภาวะที่ใช้ในการหมัก (Fermentation) และสามารถผลิต Polysaccharides ได้เป็นจำนวนมาก การผลิต Polysaccharides จากพืชมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งๆ มักจะผลิต Polysaccharides ได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ทำให้ต้องมีขั้นตอนในการแยก Polysaccharides ตัวที่ต้องการออกมา ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น (Whistler, 1993) นอกจากนี้ Polysaccharides ที่ผลิตโดยพืชส่วนใหญ่จะเป็นแบบ Intracellular โดยพืชจะสะสมส่วนของ

Polysaccharides ไว้เป็นแหล่งของพลังงาน หรือเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ และการปลูกพืชยังขึ้นกับฤดูกาล ในด้านคุณสมบัติพบว่า Polysaccharides จากพืชไม่มีคุณสมบัติเป็น Pseudoplastic (shear-thinning) ซึ่งหมายความว่า การใช้ Shear rate สูงๆ ไม่ทำให้ค่าความข้นหนืดลดลง ดังนั้น เมื่อต้องส่งผ่านของเหลวที่ผสม Polysaccharides ที่ข้น เช่น ส่งตามท่อทำให้ต้องใช้พลังงานมาก

ในบรรดา Polysaccharides ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย Xanthan gum เป็น Polysaccharides ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะให้ความข้นหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ มีคุณสมบัติ Shear-thinning มีความคงทนต่อ pH, Ionic strength และอุณหภูมิ สามารถเกิดเจลได้เมื่อผสมกับ Galactomannan (Guar gum และ Locust bean gum) (Williams *et al.*, 1991) หรือ Konjac mannan (Doublier and Llamas, 1991) ได้มีการศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิต Xanthan gum โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกมาเป็นเวลานานแล้ว อย่างไรก็ตาม Xanthan gum ก็ยังมีราคาสูงอยู่ ดังนั้น จึงยังมีความพยายามที่จะสรรหา polysaccharides ชนิดใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติดีขึ้นกว่าเดิม หรือ มีราคาถูกกว่าแต่คุณสมบัติใกล้เคียงกัน หรือ ความพยายามที่จะสรรหาเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิต Polysaccharides ชนิดเดิมได้

แนวคิดที่จะศึกษาการผลิต Polysaccharides ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก เริ่มจากการที่ยังมีความต้องการ Polysaccharides ชนิดใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติดีขึ้น หรือสามารถผลิตได้โดยมีต้นทุนที่ต่ำลง เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ซึ่งหาก Polysaccharides ชนิดใหม่ๆ นี้ ผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกก็จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ทันทีเพราะเชื้อแบคทีเรียแลคติกจัดเป็น Food-Grade Bacteria และได้รับการรับรองเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) คือ มีความปลอดภัยในการบริโภค จากการศึกษาในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นจำนวนมากที่สามารถผลิต Polysaccharides ได้ และเป็น Polysaccharides ที่สะสมอยู่ภายนอกเซลล์ (Exopolysaccharides) ดังนั้น ในการแยกเอา Polysaccharides จากการหมักจะทำได้ง่าย นอกจากนี้ เชื้อแบคทีเรียแลคติกยังเป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารจำนวนมากมายหลายชนิด ดังนั้น ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อเป็นเชื้อตั้งต้น อาจจะใช้สายพันธุ์ที่สามารถผลิต Polysaccharides ได้ ซึ่งอาจจะมีผลทำให้ลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารนั้นๆ ดีขึ้น หรือได้ลักษณะเนื้อใหม่ โดยที่ไม่ต้องแยกเอา Polysaccharides นั้นออกมาแล้วเติมกลับเข้าไปในผลิตภัณฑ์อาหาร และอีกประการหนึ่งคือ เชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อประเภท Facultative anaerobe คือ เชื้อไม่ต้องการก๊าซออกซิเจน

ในการเจริญเติบโต แต่ในการผลิต Exopolysaccharides ยังเป็นข้อโต้แย้งกันว่าต้องการ ก๊าซออกซิเจนหรือไม่ หากไม่ต้องการจะยิ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นแหล่งที่น่าสนใจ ของการผลิต Polysaccharides เพราะในการผลิต Xanthan gum เมื่อเชื้อผลิต Gum ออกมาได้ จำนวนมากและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อข้นขึ้น จะทำให้การให้ก๊าซออกซิเจนไม่เพียงพอในที่สุด และ ทำให้เชื้อหยุดการผลิต Xanthan gum (Atkinson and Mavituna, 1983)

ตัวอย่างของ Polysaccharides ซึ่งผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ Dextran, Glucan ซึ่งผลิตโดย *Leuconostoc mesenteroides*, Mutans (α -Glucan) ผลิตโดย Streptococci, Fructan โดย *Streptococcus thermophilus* นอกจากนี้ ยังมี Polysaccharides ใหม่ ๆ ผลิตโดย *Bifidobacterium longum* (Roberts et al., 1995), *Lactobacillus casei* (Kojic et al., 1992), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Garcia-Garibay and Marshall, 1991; Grobber et al., 1995), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Macura and Townsley, 1984), *Lactobacillus sake* (van den Berg et al., 1995), *Lactobacillus brevis* (Pidoux et al., 1988) ซึ่ง Polysaccharides เหล่านี้มีความแตกต่างกันในด้านคุณสมบัติ และองค์ประกอบ ของ Polysaccharides แต่พบว่า ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมี คุณสมบัติ Shear-thinning ดังนั้นจากการศึกษานี้อาจจะทำให้พบเชื้อแบคทีเรียแลคติกซึ่งเป็น สายพันธุ์พื้นเมืองที่สามารถผลิต Polysaccharides ชนิดใหม่ ๆ ได้

บทที่ 2

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับเรื่อง Polysaccharides ที่ได้ดำเนินมา ส่วนใหญ่จะเป็นเพื่อการสรรหา Polysaccharides ชนิดใหม่ๆ โดยนำ Polysaccharides ที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ อาทิ ความข้นหนืด การเกิดเจล และการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต Polysaccharides และการศึกษาเพื่อพัฒนานวัตกรรมราคาถูกลงมาใช้ งานวิจัยในยุโรป กำลังมุ่งศึกษาเพื่อสรรหาเชื้อที่ผลิต Polysaccharides ชนิดใหม่ๆ หรือ เชื้อใหม่ที่ผลิต polysaccharides ที่มีใช้อยู่แต่สามารถผลิตได้มากกว่าเดิม (Crezcenzi, 1995)

ในการศึกษานี้ จะทำการตรวจสอบการผลิต Exopolysaccharides และศึกษาคุณสมบัติที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารของ Polysaccharides ที่ผลิตได้ เพื่อสรรหา Polysaccharides ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการก่อน และหาก Polysaccharides นั้นมีความน่าสนใจ จะได้นำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ และหาวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตต่อไป

ดังที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกหลาย Species ที่สามารถผลิต Polysaccharides ได้ และแหล่งอาหารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้ถูกแยกออกมาก็แตกต่างกันไป เช่น เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* จากไวน์ (Manca de Nadra & Strasser de Saad, 1995) เชื้อ *Lactobacillus brevis* จาก Sugary kefir grains (Pidoux et al., 1988) เชื้อ *Lactobacillus casei* จาก Cheese (Kojic et al., 1992) และเชื้อ *Lactobacillus sake* จาก Salami (van den Berg et al., 1995)

การสรรหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกซึ่งผลิต Exopolysaccharides ชนิดใหม่ๆ นอกจากจะสรรหาจากเชื้อที่แยกออกมาจากผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความข้นหนืดที่ผิดปกติเกิดขึ้นแล้ว อาจทำได้โดยการนำเชื้อมาทำการคัดแยก (Screening) van den Berg และคณะ (1995) ได้ทำการคัดแยกโดยใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกจำนวน 600 สายพันธุ์ และพบเชื้อที่ผลิต Polysaccharides จำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ และ Manca de Nadra และ Strasser de Saad (1995) ได้ทำการคัดแยกจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกจากไวน์จำนวน 22 สายพันธุ์ พบเชื้อที่ผลิต Polysaccharides ได้จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จะเห็นได้ว่า โอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิต exopolysaccharides ได้

มีความเป็นไปได้ นอกจากนี้ในการศึกษาเบื้องต้นของงานวิจัยนี้ โดยการตรวจสอบการผลิต Exopolysaccharides ของเชื้อใน Genus *Pediococcus* ซึ่งแยกจากอาหารไทยหมักดอง พบว่ามีเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ จากเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด 20 สายพันธุ์ สามารถผลิต Polysaccharides ได้ ซึ่งคิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ และจากตัวอย่างเชื้อใน Genus *Lactobacillus* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวหนึ่งตัวอย่างจำนวน 3 สายพันธุ์ พบเชื้อที่สามารถผลิต Polysaccharides ได้ จำนวน 1 สายพันธุ์ คณะผู้วิจัยจึงคาดว่าจะสามารถสรรหาเชื้อแบคทีเรีย แลคติก ซึ่งแยกออกจากอาหารไทยหมักดอง ซึ่งถือว่าเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่ผลิต Exopolysaccharides ได้

ในการผลิต Exopolysaccharides ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่า เชื้อแต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิต Exopolysaccharides โดยใช้น้ำตาลต่างชนิดกัน โดยส่วนใหญ่ จะสามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารที่เชื่อนั้นๆ ถูกแยกออกมาในการผลิต Exopolysaccharides เช่น เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่แยกจากโยเกิร์ต ซึ่งมีนมเป็นองค์ประกอบหลัก มักจะสามารถผลิต Polysaccharides จากน้ำตาลแลคโตส ซึ่งเป็น น้ำตาลหลักในนม (Garcia-Garibay and Marshall, 1991; Grobber *et al.*, 1995) เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* จากไวน์ สามารถผลิต Exopolysaccharides ได้จากน้ำตาล หลายชนิด คือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส แต่ปริมาณ Polysaccharides ที่ผลิตจากน้ำตาล ซูโครสจะสูงที่สุด (Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995) ดังนั้น ในการสรรหาเชื้อ แบคทีเรียแลคติกที่ผลิต Exopolysaccharide จึงควรจะได้ทำการแปรชนิดของน้ำตาลด้วย

ปริมาณน้ำตาลก็มีผลต่อการผลิต Exopolysaccharides ในการทดลองของ Grobber และคณะ (1995) พบว่า การผลิต exopolysaccharides ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคส และได้สรุปว่า น้ำตาลกลูโคส เมื่อ ปริมาณมีต่ำกว่า 100 มิลลิโมลต่อลิตร (18 กรัมต่อลิตร) เป็นสารที่จำกัด (Limiting substrate) การผลิต Exopolysaccharides ในการทดลองของ Cerning และคณะ (1992) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียแลคติก *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* และ *Lactobacillus casei* ssp. *casei* ใน Ultrafiltrate ซึ่งเป็นนมที่ผ่านการแยกเอาโปรตีนและไขมันออกบางส่วน พบว่า ถ้ามีการ เติม Casamino acids 1 เปอร์เซ็นต์ และมี Glucose หรือ Sucrose อยู่ด้วย จะทำให้การผลิต Polysaccharides เพิ่มขึ้น และสรุปว่าการเติม Glucose หรือ Sucrose จะช่วยทำให้เชื้อสามารถ ผลิต Polysaccharides ได้มากขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การผลิต Exopolysaccharides ของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสูงขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณสูง และที่อุณหภูมิต่ำ (Sutherland, 1977; Souw and Demain, 1979; Arad et al., 1988; Shu and Yang, 1990) อย่างไรก็ตาม ในเชื้อแบคทีเรียแลคติกพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Polysaccharides แตกต่างกันไป บางสายพันธุ์จะผลิต Polysaccharides ได้ดีที่สภาวะที่ไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต กล่าวคือ สภาวะที่ปริมาณ Nitrogen น้อย และจำกัด (N-limited) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลสูง (Sutherland, 1979; Cerning, 1990) หรือเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต (Cerning et al., 1992)

ในการทดลองของ Cerning และคณะ (1992) ได้ใช้อุณหภูมิ 18 และ 25 องศาเซลเซียส ในการทดลองเพื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* และ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* เพื่อเพิ่มการผลิต Polysaccharides แต่ในการทดลองของ Grobber และคณะ (1995) โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* โดยเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบแน่นอน (Chemically defined medium) พบว่า เชื้อนี้สามารถผลิต Polysaccharides ได้มากขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น และผลิตได้มากที่สุดที่ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Garcia-Garibay และ Marshall (1991) ซึ่งพบว่า เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ผลิต Polysaccharide ได้ในอัตราที่สูงขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 48 องศาเซลเซียส และมีอัตราการเจริญเติบโตน้อย แต่ปริมาณที่ผลิตได้จะสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จากการศึกษาในเชื้อ *Bifidobacterium longum* พบว่า เชื้อผลิต Polysaccharides ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้าง Cell mass และการผลิต Metabolite (Andaloussi et al., 1995) อย่างไรก็ตาม ใน *Lactobacillus sake* พบว่า เชื้อผลิต Exopolysaccharides ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ โดย Yield ของ Exopolysaccharides ต่อ Cell mass จะสูงขึ้น เมื่อลดอุณหภูมิลงและพบว่า ค่า Yield นี้สูงที่สุดที่ 10 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า เชื้อสามารถผลิต Exopolysaccharides ได้ในปริมาณมากที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส (van den Berg et al., 1995)

ผลของสภาวะที่ใช้ในการหมักต่อการผลิต Exopolysaccharides ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป อาจเป็นเพราะกลไกการผลิต Exopolysaccharides ของเชื้อแตกต่างกัน เช่น หากการผลิต Exopolysaccharides เกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต

(Growth-associated) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Exopolysaccharides เพื่อให้ได้ปริมาณมากควรจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการที่จะทำให้ช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นไปได้ยาวนานในขณะที่เชื้อมีอัตราการผลิต Exopolysaccharides สูง ได้มีการรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์มีการผลิต Exopolysaccharides ที่เกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตและเชื้อจะหยุดการผลิต Exopolysaccharides เมื่อการเจริญเติบโตสิ้นสุดลง เช่น เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Grobben et al., 1995) *Lactobacillus sake* (van den Berg et al., 1995) *Bifidobacterium longum* (Andaloussi et al., 1995) *Pediococcus pentosaceus* (Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995) และในเชื้อบางสายพันธุ์การผลิต Exopolysaccharides ก็ไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมๆกับการเจริญเติบโต เช่น ในรายงานของ Lonvaud-Funel and Jojeux (1988) ซึ่งใช้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* พบว่าการผลิต Exopolysaccharides เริ่มต้นเมื่อหมดการเจริญเติบโตในช่วง Log phase

จากการศึกษาการผลิต Xanthan gum และ Polysaccharides ชนิดอื่นๆของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ส่วนใหญ่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโตและในการผลิต Exopolysaccharides (Atkinson and Mavituna, 1983; Cerning, 1990) สำหรับเชื้อแบคทีเรียแลคติก ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อประเภท Facultative anaerobe คือ ไม่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนเล็กน้อยหรือไม่มีก๊าซออกซิเจนก็ได้ ซึ่งลักษณะนี้ทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีความน่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งผลิต Polysaccharides มาก อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้จะได้ศึกษามลของการให้อากาศซึ่งจะเป็นการเพิ่มปริมาณก๊าซออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิต Exopolysaccharides ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์สำคัญ

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง รุ่น ϕ 43 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/vis Spectrophotometer) รุ่น UV-160 A
ของบริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Safecard ของบริษัท Clay-Adams, USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuged)
ของบริษัท Hitachi, Japan.

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH - C01 - 764604 ของบริษัท Olympus Optical , Japan.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama, Japan.

ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิต่ำ (Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
รุ่น Biofreezer ของบริษัท Forma Scientific, USA.

ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535
ของบริษัท Sunyo, Japan.

กระดาษกรอง (Millipore membrane) ขนาด pore size 0.20 ไมครอนเมตร
ของบริษัท Whatman, USA.

Scanning Electron Microscope ของบริษัท Shimadzu, Japan.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของบริษัท Forma Scientific, USA.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixture) ของบริษัท Scientific industries, USA.

ถุงไดอะไลซิส (Dialysis bag) ของบริษัท Spectrum medical industries, USA.

เครื่องทำแห้งโดยใช้ความเย็น (Freezer-dryer) ของบริษัท Dura-Dry, USA.

เครื่อง Magnetic stirrer รุ่น M22/1 ของบริษัท Frang morat , USA.

เครื่องปั๊มอุณหภูมิ $^{\circ}\text{C}$ รุ่น Precision ของบริษัท Precision, USA.

ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนอุณหภูมิ 180°C (Oven) ของบริษัท Heraeus, USA.

เครื่อง High performance liquid chromatography รุ่น GC9A

ของบริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องวัดค่าความหนืด (Haake rotoviscometer) รุ่น RV20 ของบริษัท Haake, USA.

เครื่อง High performance size exclusion chromatography ของบริษัท Waters, USA.

เครื่อง Klett - Summerson

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

โปรติโอสเปปโตน (Proteose peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

เนื้อวัวสกัด (Beef extract) ของบริษัท Gibco Laboratories, USA.

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ทวิน 80 (Tween 80) ของบริษัท Merck, Germany.

ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)

ของบริษัท Difco Laboratories, USA

โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

ไดแอมโมเนียมซิเตรท (Diammonium citrate) ของบริษัท Merck, Germany

แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ของบริษัท Merck, Germany

น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Germany

น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

น้ำตาลแลคโตส (Lactose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

3. สารเคมีสำหรับทดสอบทางด้านชีวเคมี (Biochemical characteristics)

3.1 สารเคมีสำหรับย้อมแกรม

คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ของบริษัท Carlo, USA
 เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ของบริษัท Merck, Germany
 แอมโมเนียมออกซาเลท (Ammonium oxalate) ของบริษัท Merck, Germany.
 ไอโอดีน (Iodine) ของบริษัท Ajax Chemical, USA,
 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ของบริษัท Carlo, USA
 ซัลฟานิน (Safranin O) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

3.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

3.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.
 โพแทสเซียมไนเตรท (Potassium nitrate) ของบริษัท Merck, Germany.
 ซัลฟานิลิกแอซิด (Sulphanilic acid) ของบริษัท Sigma Company, USA.
 อะซิติกแอซิด (Acetic acid) ของบริษัท Merck, Germany.
 แอลฟาแนฟทิลลามีน (α -Naphthylamine) ของบริษัท Merck, Germany.

3.4 สารเคมีสำหรับทดสอบการสลายเอสคูลิน (Esculin test)

เอสคูลิน (Esculin) ของบริษัท Merck, Germany.
 เฟอริกซิเตรท (Ferric citrate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Germany.
 เนื้อวัวสกัด (Beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
 ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท Merck, Germany.
 ยีสต์เอ็กซ์แทรก (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

3.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบการสลายอาร์จินีน (Arginine test)

พาราฟิน (Parafin) ของบริษัท Whatman, USA.

โปรตีโอสเปปโตน (Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)

ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แอลอาร์จินีนไฮโดรคลอไรด์ (L(+)-arginine HCl) ของบริษัท Sigma

Chemical Company, USA.

ฟีนอล เรด (Phenol red) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

วุ้น (Agar) ของบริษัท Merck, Germany.

3.6 สารเคมีสำหรับการทดสอบการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต

3.6.1 Mixed indicator

บรอมไธมอล บลู (Bromthymol blue) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

นิวทรัล เรด (Neutral red) ของบริษัท Merck, Germany.

เอทิล แอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ของบริษัท Merck, Germany.

3.6.2 Titrant

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

3.6.3 Carbohydrate

ไรโบส (Ribose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

อะราบิโนส (Arabinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ไซโลส (Xylose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แมนนิทอล (Mannitol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แลคโตส (Lactose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

มอลโตส (Maltose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แรมโนส (Rhamnose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 เมลลิไซโตส (Melizitose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 เด็กซ์ทริน (Dextrin) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 แป้ง (Starch) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 เมลลิไบโอส (Melibiose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 เซลโลไบโอส (Cellobiose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 ซอร์บิทอล (Sorbitol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 แมนโนส (Mannose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 ฟรุคโตส (Fructose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 อะราบินโนส (Arabinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
 ราฟฟิโนส (Raffinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

3.7 เคมีภัณฑ์สำหรับตกตะกอนเอกโซพอลิแซคคาไรด์

เอทิล แอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) (95%) ของบริษัท Merck, Germany.

3.8 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านเคมี

3.8.1 Total sugar

ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท Merck, Germany.

ซัลฟูริกแอซิด (Sulphuric acid) ของบริษัท Carlo, USA

3.8.2 Total nitrogen

โคแมสซีบลู (Coomassie blue) Merck, Germany.

โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma
 Chemical Company, USA.

3.8.3 การวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

อะซีโตไนไตร (Acetonitrile) ของบริษัท Merck, Germany.

3.8.4 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซคคาไรด์

เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride)

ของบริษัท Merck, Germany.

3.9 การตรวจสอบคุณสมบัติของ polysaccharide เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

3.9.1 สารเคมีสำหรับตรวจสอบคุณสมบัติด้านความหนืด

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

ของ บริษัท Merck, Germany.

ไฮโดรคลอริกแอซิด (Hydrochloric acid)

ของ บริษัท Merck, Germany.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)

ของบริษัท Merck, Germany.

แซนแทนกัม (Xanthan gum) (Sanofi, Commercial grade)

3.9.2 สารเคมีสำหรับทดสอบความเป็นสาร Emulsifer

Tris-Magnesium Buffer

3.9.3 สารเคมีสำหรับทดสอบความเป็นสาร Stabilizer

Viscarin SD389 (FMC Corporation, USA)

ขั้นตอนการทดลอง

1. แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ศึกษาและการแยกเชื้อจากอาหารหมักดองและน้ำอ้อย

ได้รับเชื้อจาก รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ซึ่งแยกจากเหนม ใ้สกัดเปรี้ยว ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หน่อไม้ดอง ปลาต้ม ส้มผัก ไข่ปลาดอง หอมดอง ใบ เมี่ยงหมัก และแยกเพิ่มเติมจากอาหารไทยหมักดองรวมทั้งน้ำอ้อย (ตารางที่ 1) โดยนำ ตัวอย่างอาหารหรือน้ำอ้อยมาทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ เพื่อให้ปริมาณเชื้อใน ตัวอย่างลดลงเป็นลำดับ ดูดตัวอย่างที่ได้มาใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารวุ้น MRS (de Man *et al.*, 1960) ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิไม่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ลงไปเขย่าให้เชื้อ และอาหารกระจายทั่ว (pour plate technique) แล้วบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เมื่อ เชื้อเจริญแล้ว เลือกเก็บโคโลนีในวันนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย streak บนอาหารวุ้น MRS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

2. การจัดกลุ่มเชื้อขึ้นต้น

นำเชื้อที่ได้มาตรวจสอบลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การสร้างเอนไซม์ แคตาเลส และการสร้างแก๊สจากกลูโคสในอาหาร MRS เพื่อจัดกลุ่มเชื้อ แบคทีเรียแลคติกขึ้นต้น

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิต EPS ได้บนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง ได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* จำนวน 102 เชื้อ และเชื้อ *Leuconostoc* ที่แยกได้จากน้ำอ้อยจาก โรงงานน้ำตาล จำนวน 23 เชื้อ มาตรวจสอบความสามารถในการผลิต EPS โดยใช้วิธี streak เชื้อบนอาหารวุ้น MRS (de Man *et al.*, 1960) และในอาหารเหลว MRS ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อ แบคทีเรียแลคติกเติบโตได้ดี โดยมีส่วนประกอบดังนี้

Proteose peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10.0	กรัมต่อลิตร

Sugar	30.0	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5.0	กรัมต่อลิตร
Diammonium citrate	2.0	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1.0	กรัมต่อลิตร
MnSO ₄ · H ₂ O	0.05	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	2.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร (เฉพาะในอาหารแข็ง)

ในการศึกษาจะทำการแปรชนิดของน้ำตาล คือ กลูโคส แลคโตส ซูโครส และฟรุคโตส สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิต EPS ได้หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะให้สารที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มบนอาหารแข็ง สำหรับในอาหารเหลวจะพบว่า หลังจากที่น่าอาหารที่เลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ส่วนของอาหารเหลวจะยังมีลักษณะขุ่นขาว การวัดปริมาณ EPS จะทำโดยแยกตะกอนของเซลล์ออกแล้วนำส่วนของ supernatant ไปทำการตกตะกอน EPS โดยใช้เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการวัดปริมาณ EPS ตามวิธีของ Kinery และคณะ (1969)

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ

นำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้าง EPS ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อเป็นแนวทางพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ โดยยึดแนวจัดจำแนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler and Weiss, 1986) และหนังสือ The Prokaryotes (Balows *et al.*, 1992)

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการตรวจสอบและบันทึกลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS วัดขนาดของเซลล์ (Cell size) ด้วยไมโครมิเตอร์ ตรวจสอบการติดสีแกรม (Gram reaction)

(ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 1) รูปร่างของเซลล์ (Cell form) และการจัดเรียงตัวของเซลล์ (Cell arrangement) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 การทดสอบการเจริญที่ pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือต่างๆ กัน

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่แปร pH เป็น 4, 4.5, 8.0 และ 8.5 อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส และการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ ตรวจสอบการสร้างกรดโดยหยด Mixed indicator (ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 5) ลงไป ถ้ามีสีเกิดขึ้นแสดงว่ามีกรดสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วนำมาไทเทรตด้วย NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อดูปริมาณการสร้างกรด

4.3 ลักษณะทางชีวเคมี

4.3.1 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)

ทดสอบโดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีของเชื้อที่มีอายุ 3 วัน ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ catalase

4.3.2 การรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวไนเตรต แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน ทดสอบโดยหยดกรดซัลฟานิลิก และแอลฟาเนฟริลอะมีน ถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ ถ้าไม่ให้ผลดังกล่าว ทดสอบยืนยันโดยใส่ผงสังกะสี ผลการทดสอบจึงเป็นลบแท้จริงแต่ถ้าไม่เกิดสีแดงผลการทดสอบรีดิวซ์ไนเตรตนั้นเป็นจริง

4.3.3 การสลายเอสคูลิน (Hydrolysis of esculin)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Esculin แล้วบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาล

4.3.4 การสลายอาร์จินีน (Hydrolysis of arginine)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Arginine แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ผลการทดสอบเป็นบวก

4.3.5 การทดสอบการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต

เลี้ยงเชื้อในอาหารคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำตาลไรโบส อะลาบินอส ไฮโลส แมนนิทอล แลคโตส มอลโตส เมลลิไซโทส เมลลิโบไอส เซลโลโบไอส ซอร์บิตอล ซาลิซิน ซอร์บิต แมนโนส ฟรุคโตส ทีฮาโลส ราฟไฟโนส เป็นต้น หลังจากเพาะเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ตรวจผลการสร้างกรดโดยหยด Mixed indicator ลงไปถ้ามีสีเกิดขึ้นแสดงว่ามีการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วนำมาไทเทรตด้วย NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อดูปริมาณการสร้างกรด

5. การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิต EPS

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิต EPS ในอาหารเหลว MRS (de Man *et al.*, 1960) ที่มีชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS ที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้เชื้อตั้งต้น (Starter) ที่มีอายุ 12-16 ชั่วโมง ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ใน 24 ชั่วโมงแรก

ประเมินผลการทดลอง

- วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter
- วัดปริมาณเซลล์ (van den Berg *et al.*, 1995)
- วัดปริมาณ EPS (Kinery *et al.*, 1969)

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ที่มีอัตราการสร้าง EPS สูงมาเลี้ยงในอาหาร MRS (de Man *et al.*, 1960) โดยใช้เชื้อตั้งต้น (Starter) ที่มีอายุ 12-16 ชั่วโมง 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร

ต่อปริมาตร) สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 เวลาในการบ่ม 72 ชั่วโมง โดยแปรองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

6.1 องค์ประกอบของอาหาร

6.1.1 ปริมาณน้ำตาล

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS โดยใช้น้ำตาลที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS จากข้อ 2.3 โดยแปรปริมาณน้ำตาลเป็น 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5

6.1.2 ปริมาณไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมจากข้อ 6.1.1 แล้วแปรแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วย Proteose peptone, Beef extract และ Yeast extract โดยแปร Yeast extract เป็น 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร Proteose peptone และ Beef extract เป็น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร วางแผนการทดลองเป็นแบบ Symmetric Factorial design ขนาด 4x4x4 การทดลอง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5

6.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

6.2.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่า

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของ น้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน และแร่ธาตุที่เหมาะสมจากข้อ 6.1.1 และ 6.1.2 ตามลำดับ เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารต่างกันโดยแปรปริมาตรอาหารเป็น 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 มิลลิลิตร และทดลองเปรียบเทียบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที กับการไม่เขย่า วางแผนการทดลองเป็นแบบ Asymmetric factorial design ขนาด 4x2 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5

6.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน อัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS จากข้อ 6.1.1, 6.1.2 และ 6.2.1 ตามลำดับ โดยแปรอุณหภูมิเป็น 20, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5

7. การทำให้ EPS บริสุทธิ์บางส่วน (EPS Partial purification)

เมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติก และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS ได้แล้ว นำเชื้อนั้นมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml. เพื่อให้ได้ปริมาณมากขึ้น โดยนำเชื้อมาเลี้ยงตามสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 2 วัน นำไปปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่อง Refrigerated centrifuge ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (Abbad *et al.*, 1995) ทำการปั่นแยกเซลล์ 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายส่วนใสไป ตกตะกอนโดยใช้เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกอีกครั้งด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วละลาย EPS ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปทำการ Dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วัน (เปลี่ยนน้ำวันละ 2 ครั้ง) แล้วจึงนำสารละลาย EPS ที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer

8. การศึกษาคุณสมบัติของ EPS ทางด้านกายภาพและเคมี

นำ EPS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 7 มาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดังนี้

8.1 ชนิดประจุของโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้วิธีของ (Ueda *et al.*, 1981)

8.2 การทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของ EPS โดยใช้วิธีของ (Leon-Barrios *et al.*, 1992)

8.3 การทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่อง HPSEC

8.4 การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

โดยใช้วิธี Phenol sulfuric (Dubios *et al.*, 1956)

8.5 การทดสอบหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

โดยใช้วิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)

9. การตรวจสอบคุณสมบัติของ Polysaccharide เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

9.1 การศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืดของ EPS ในน้ำกลั่นความเข้มข้นต่าง ๆ

นำ EPS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากข้อ 7 มาละลายในน้ำกลั่นโดยแปรความเข้มข้นของ EPS เป็น 7 ระดับ ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง โดยพิจารณาความเข้มข้นของ EPS ที่ให้ความหนืดใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

9.1.1 ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติด้านความหนืด

นำ EPS มาละลายในน้ำกลั่นโดยใช้ความเข้มข้นที่ให้ค่าความหนืดใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ 9.1 แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 50, 70, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายทั้งหมดไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง

9.1.2 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติด้านความหนืด

นำ EPS มาละลายด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 9.1 ในสารละลายที่มีการปรับให้ได้ pH ตามต้องการ 2 แบบ คือ การใช้ NaOH หรือ HCl กับการใช้ฟอสเฟอ์ โดยปรับให้ได้ pH เป็น 6 ระดับ คือ 2, 4, 6, 8, 10, 12 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง

9.1.3 ผลของเกลือต่อคุณสมบัติด้านความหนืด

นำ EPS มาละลายในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 9.1 แล้วเติมเกลือที่แปรเป็น 2 ชนิด คือ NaCl และ KCl และแปรปริมาณความเข้มข้นของเกลือเป็น 0, 1, 2, 4, 6, 8, และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดความหนืดด้วย

เครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง

9.2 ความสามารถในการเป็น Emulsifier

ทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีของ Kaplan and Rosenberg (1982) ดังนี้ นำ Polysaccharides มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืชในอัตราส่วน 1:1 (ใช้ปริมาตร 0.1-0.5 มิลลิลิตร) นำมาเติมในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งมี Tris-magnesium buffer (20 mM Tris, pH 7.0 + 2 mM MgSO₄) ในปริมาณที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 7.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตรา 150 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่อง Klett-Summerson Photometer (Green filter)

9.3 ความสามารถในการเป็น Stabilizer

นำ Polysaccharides ที่ได้มาทดลองใช้ในผลิตภัณฑ์นมรสโกโก้ โดยใช้ความเข้มข้นของ Polysaccharides ต่าง ๆ กัน และเปรียบเทียบกับการใช้ Stabilizer ที่มีขายในท้องตลาด Carrageenan สำหรับนมช็อคโกแลตได้ทำการติดตามการตกตะกอนของผงโกโก้ โดยเปรียบเทียบปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยวิธีเดียวกันหลังจากเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลของแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาและการแยกเชื้อจากอาหารหมักดองและน้ำอ้อย

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองจำนวน 50 เชื้อ โดยมีแหล่งที่ใช้ในการแยก ได้แก่ หน่อไม้ดอง, แหนมหมู, แหนมเนื้อ และจากน้ำอ้อย นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำการแยกโดย รองศาสตราจารย์ ดร.สมบุญ ธนาศุภวัฒน์ จำนวน 75 เชื้อ โดยมีแหล่งที่ใช้ในการแยกคือ ไข่ปลาดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง ถั่วงอกดอง ปลาเจ้า ปลาลัม แหนมหมู แหนมเนื้อ ไข่กรอกเปรี้ยว ส้มพริก มั่ม ใบเมี่ยงหมัก หอมดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก ผักกุ่มดอง ผักหนามดอง เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1

2. ผลการจัดกลุ่มเชื้อขึ้นต้น

เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อโดยพิจารณาจากรูปร่างเซลล์ การสร้างเอนไซม์แคตาเลส และการสร้างแก๊สจากกลูโคส พบว่าเชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนี กลมมน สีขาว ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส นอกจากนี้ยังสามารถแยกสายพันธุ์ที่ต่างกันโดยอาศัยรูปร่างของเซลล์ ถ้ามีรูปร่างเป็นแท่ง (Rod) จำนวน 75 เชื้อ ส่วนเชื้อที่มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นแบบสี่เซลล์ (Tetrad) และไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 22 เชื้อ ส่วนเชื้อที่มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นสาย และสร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 28 เชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ ตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แบบที่เรียลแลคติดที่ได้จากอาหารหมักดองและน้ำอ้อย

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	
	แยกใหม่	เชื้อที่ได้รับจาก รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์
ไข่ปลาดอง	-	A314
ผักเสี้ยนดอง	-	P46-1, KM1-2, F11-1, F18-1, F18-2, F19-1, N35, N37
หน่อไม้ดอง	RS27, RS28, RS31, RS32	F28-3, F21-1, F32-1, P305, P319, P322-1
ถั่วงอกดอง	-	P10-2, F10-1
ปลาเจ้า	-	FN12-1
ปลาส้ม	-	A24, A83, F28-1, F36-1, F36-2, F37-1, FN2, N31
แหนมหมู	RS43, RS44, RS46, RS55, RS56, RS62, RS74, RS93, RS94, RS95, RS96, RS97, RS98, RS90, RS91, RS92, AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, AP-5, BP-1	A27-2, FN1-3, FN3s, FN4, FN45sr, FN8, KM4-2, FN1-4, F3-1, N53, N38, N78, N01, N63, N148, N299, N256
แหนมเนื้อ	RS77	-
ได้กรอกเปรี้ยว	-	A35, F7-1, KM20, N278
ทุเรียนเปรี้ยว	-	A330
ส้มผัก	-	F31-5, F3-9, F35-1, N295, F36-2

ตารางที่ 1 (ต่อ) แบคทีเรียแลคติกที่ได้จากอาหารหมักดองและน้ำอ้อย

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	
	แยกใหม่	เชื้อที่ได้รับจาก รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์
นม	-	F33-1, FP48-1
ใบเมี่ยงหมัก	-	A1, A4, F11-1, FP18, FP38-1, FP41-1, FP46-2, FP37-1
หอมดอง	-	P2-4, F2-1, F20, FS-15, P2-4
ผักกาดดอง	-	P7-1
ข้าวหมาก	-	KM1-1, KM13
ผักกุ่มดอง	-	KM10, P30-1, FP51-1
ผักหนามดอง	-	P16
น้ำอ้อย	LE11-1, LE11-2, LE11-3, LE12-2, LE12-2, LE13-1, LE13-2, LE14-2, LE15-4, LE16-1, LE16-2, LE16-4, LE21-1, LE21-2, LE21-3, LE22-1, LE22-2, LE22-3, LE22-4, LE23-1, LE23-2, LE26-1, LE26-3	-

ตารางที่ 2 ลักษณะของกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ใหม่

รหัสเชื้อ	รูปร่างเซลล์ (Cell form)	แคตาเลส (Catalase)	แก๊สจากกลูโคส (Gas from glucose)
RS27	Rod	-	-
RS28	Rod	-	-
RS31	Rod	-	-
RS32	Rod	-	-
RS43	Rod	-	-
RS44	Rod	-	-
RS46	Rod	-	-
RS55	Rod	-	-
RS56	Rod	-	-
RS62	Cocci in chain	-	+
RS74	Rod	-	-
RS93	Rod	-	-
RS94	Rod	-	-
RS95	Cocci in chain	-	+
RS96	Cocci in chain	-	+
RS97	Cocci in chain	-	+
RS98	Cocci in chain	-	+
RS90	Tetrad	-	-
RS91	Tetrad	-	-
RS92	Tetrad	-	-
AP-1	Tetrad	-	-
AP-2	Tetrad	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะของกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ใหม่

รหัสเชื้อ	รูปร่างเซลล์ (Cell form)	แคตาเลส (Catalase)	แก๊สจากกลูโคส (Gas from glucose)
AP-3	Tetrad	-	-
AP-4	Tetrad	-	-
AP-5	Tetrad	-	-
BP-1	Tetrad	-	-
RS77	Rod	-	-
LE11-1	Cocci in chain	-	+
LE11-2	Cocci in chain	-	+
LE11-3	Cocci in chain	-	+
LE12-1	Cocci in chain	-	+
LE12-2	Cocci in chain	-	+
LE13-1	Cocci in chain	-	+
LE13-2	Cocci in chain	-	+
LE14-2	Cocci in chain	-	+
LE15-4	Cocci in chain	-	+
LE16-1	Cocci in chain	-	+
LE16-2	Cocci in chain	-	+
LE16-4	Cocci in chain	-	+
LE21-1	Cocci in chain	-	+
LE21-2	Cocci in chain	-	+
LE21-3	Cocci in chain	-	+
LE22-1	Cocci in chain	-	+
LE22-2	Cocci in chain	-	+
LE22-3	Cocci in chain	-	+

ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะของกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ใหม่

รหัสเชื้อ	รูปร่างเซลล์ (Cell form)	แคตาเลส (Catalase)	แก๊สจากกลูโคส (Gas from glucose)
LE22-4	Cocci in chain	-	+
LE23-1	Cocci in chain	-	+
LE23-2	Cocci in chain	-	+
LE26-1	Cocci in chain	-	+
LE26-3	Cocci in chain	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แบบที่เรียลแลคติดทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาแบ่งกลุ่มตามลักษณะทาง
 สัณฐานวิทยาและชีวเคมี

ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	จำนวน (สายพันธุ์)	รหัสเชื้อ
รูปร่างเป็นแท่ง	75	A314, P46-1, P28-3, F10-2, FN12-1, KM1-2, A1, A4, A24, A27-2, A35, A83, A330, F11-1, F18-1, F18-2, F19-1, F21-1, F28-1, F31-1, F32-1, F36-1, F36-2, F37-1, FS-15 F372, FN1-3, FN2, FN3s, FN3r, FN4, FN4sr, FN8, F11-1, FP18, FP38-1, FP41-1, FP46-2, P2-4, P7-1, P305, P319, P322-1, F2-1, F3-9, F7-1, F10-1, F33-1, F35-1, FP48-1, KM1-1, KM4-2, KM10, KM13, KM20, P16, P30-1, F3-1, FN1-4, F20, FP37-1, FP51-1, RS27, RS28, RS31, RS32, RS43, RS44, RS46, RS55, RS56, RS74, RS77, RS93, RS94
รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นสี่เหลี่ยม ไม่สร้างแก๊สจาก กลูโคส	22	RS90, RS91, RS92, AP-4, AP-5, N53, N31, N37, N38, N78, N256, N278, N295, AP-1, AP-2, AP-3, N01, N35, N63, N145, N299, BP-1
รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นสาย สร้างแก๊สจากกลูโคส	28	LE11-1, LE11-2, LE11-3, LE12-1, LE12-2, LE13-1, LE13-2, LE14-2, LE15-4, LE16-1, LE16-2, LE16-4, LE21-1, LE21-2, LE321-3, LE22-1, LE22-2, LE22-3, LE22-4, LE23-1, LE23-2, LE26-1, LE26-3, RS62, RS95, RS96, RS97, RS98

3. ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิต EPS ได้บนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองและน้ำอ้อยทั้งหมดมาตรวจสอบความสามารถในการผลิต EPS โดย streak บนอาหารวุ้น และในอาหารเหลว MRS (De Man *et al.*, 1969) ที่แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็น 4 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส แลคโตส และฟรุคโตส พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารเมือก EPS บนอาหารวุ้นที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเป็นเชื้อที่แยกได้จากอาหารหมักดอง 9 เชื้อ ได้แก่ F11-1, F7-1, F20, F51-1, AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 และ AP-5 ดังแสดงในตารางที่ 4 และพบว่าเชื้อที่แยกได้จากน้ำอ้อยจำนวน 16 เชื้อ ซึ่งได้แก่ LE11-1, LE11-2, LE11-3, LE12-1, LE12-2, LE13-1, LE13-2, LE14-2, LE15-4, LE16-1, LE16-2, LE16-4, LE21-1, LE21-2, LE21-3 และ LE22-1 ก็มีความสามารถสร้างสารเมือกบนอาหารวุ้นเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 5

เนื่องจากการผลิต Microbial polysaccharides ทางการค้ามักจะทำการผลิตในอาหารเหลว เช่น Xanthan gum เป็นต้น ดังนั้นจึงนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาทดสอบการสร้าง EPS ในอาหารเหลว พบว่าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้าง EPS ได้ในอาหารเหลวหรือสร้างได้ก็น้อยมาก มีเพียง AP-1, AP-3, LE13.1 และ LE13.2 ที่สามารถสร้าง EPS ได้ในอาหารเหลวสูงกว่า 0.1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวที่มีแหล่งของคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส โดยผลิตได้ 6 กรัมต่อลิตร 2.5 กรัมต่อลิตร 2.1 กรัมต่อลิตร และ 1.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยแสดงการสร้าง EPS บนอาหารแข็งดังแสดงในรูปที่ 1-4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงผลการสร้าง EPS บนอาหารวุ้น MRS ที่แปรชนิดของน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักดอง

รหัสเชื้อ	ชนิดน้ำตาล			
	Sucrose	Lactose	Fructose	Glucose
AP-1	+	-	-	-
AP-2	+	-	-	-
AP-3	+	-	-	-
AP-4	+	-	-	-
AP-5	+	-	-	-
FP51-1	+	-	-	-
F7-1	+	-	-	-
F20	+	-	-	-
F11-1	+	-	-	-

+ = เชื้อมีการสร้างเมือก (slime) บนอาหารแข็ง

- = เชื้อไม่มีการสร้างเมือก (slime) บนอาหารแข็ง

ตารางที่ 5 แสดงผลการสร้าง EPS บนอาหารวุ้น MRS ที่แปรชนิดน้ำตาลของเชื้อ
 แบคทีเรียแลคติกที่แยกจากน้ำอ้อย

รหัสเชื้อ	ชนิดน้ำตาล			
	Sucrose	Lactose	Fructose	Glucose
LE11-1	+	-	-	-
LE11-2	+	-	-	-
LE11-3	+	-	-	-
LE12-1	+	-	-	-
LE12-2	+	-	-	-
LE13-1	+	-	-	-
LE13-2	+	-	-	-
LE14-2	+	-	-	-
LE15-4	+	-	-	-
LE16-1	+	-	-	-
LE16-2	+	-	-	-
LE16-4	+	-	-	-
LE21-1	+	-	-	-
LE21-2	+	-	-	-
LE21-3	+	-	-	-
LE22-1	+	-	-	-

+ = เชื้อมีการสร้างเมือก (slime) บนอาหารแข็ง

- = เชื้อไม่มีการสร้างเมือก (slime) บนอาหารแข็ง



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีสของเชื้อ AP-1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 % เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีสของเชื้อ AP-3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 % เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ LE13-1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 %
เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ LE13-2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 %
เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 6 แสดงผลการสร้าง EPS ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 %
เป็นองค์ประกอบ

รหัสเชื้อ	ปริมาณ EPS (g/L) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
AP-1	6.0 ^a \pm 0.42
AP-3	2.5 ^b \pm 0.13
LE13-1	2.1 ^c \pm 0.05
LE13-2	1.96 ^d \pm 0.17

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน

4. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ

เมื่อนำเชื้อที่สามารถสร้าง EPS ได้มาศึกษาลักษณะทั่วไป ได้แก่ รูปร่างเซลล์ ขนาดเซลล์ และการจัดเรียงเซลล์ คุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การย่อยสลาย Arginine, การย่อยสลาย Esculin คุณสมบัติการเจริญเมื่อมีเปอร์เซ็นต์เกลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิต่างๆ นอกจากนี้ยังศึกษาการสร้างกรดในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ F7-1, F11-1, F20 และ FP51-5 ที่นำมาศึกษานั้นเมื่อเจริญบนอาหาร MRS ที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบจะสร้างสารเมือกเยิ้ม พบว่า ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างแท่ง (rod) มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบ เดี่ยว คู่ และอาจพบชนิดเป็นสายสั้น ๆ มีขนาดเซลล์ 0.5-1.0 x 1.0-3.0 ไมโครเมตร F7-1 และ F11-1 สามารถสร้างย่อยสลาย Arginine ส่วน F20 และ FP51-1 ไม่สามารถย่อยสลาย Arginine ได้ โดยเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 4.0, 4.5, 8.0 และ 8.5 โดย F11-1 มีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่เกลือความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ F7-1, F20 และ FP51-1 สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0, 4.0 และ 6.0 โดยที่ไม่เจริญเมื่อมีเกลือเข้มข้นสูงถึง 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยมีความสามารถในการเจริญในน้ำตาลแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8 เชื้อนี้จัดเป็น *Lactobacillus* species (Kandler and Weiss, 1986)

ตารางที่ 7 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สร้าง EPS

ลักษณะ	รหัสเชื้อ			
	F7-1	F11-1	F20	FP51-1
Cell form	Rods			
Cell size (μm)	0.5-1.0x1-3.0 or more			
Cell arrangement	Single, in pairs or short chains			
Hydrolysis of Arginine	-	-	+	+
Hydrolysis of Esculin	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-
Growth in NaCl 2 %	+	+	+	+
NaCl 4 %	+	+	+	+
NaCl 6 %	+	+	+	+
NaCl 8 %	-	+	-	-
NaCl 10 %	-	-	-	-
Growth in pH 4.0	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+
pH 8.5	+	+	+	+
Growth at temp 15 °C	+	+	+	+
45 °C	-	-	-	-

หมายเหตุ

+ = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

ตารางที่ 8 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สร้าง EPS

คาร์โบไฮเดรต	รหัสเชื้อ			
	F7-1	F11-1	F20	FP51-1
Amygdalin	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+
glucose	+	+	+	+
Gluconate	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-
Lactose	-	+	-	-
Maltose	+	+	-	-
Mannitol	+	+	-	-
Mannose	+	+	+	+
Melibiose	-	+	-	-
Melzitose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Ribose	+	+	-	-
Salicin	+	-	+	+
Sorbitol	+	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+
Trehalose	+	-	-	-
Xylose	-	-	+	+

หมายเหตุ + = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ AP-1 และ AP-3 ที่นำมาศึกษานั้นเมื่อเจริญบนอาหาร MRS ที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบจะสร้างสารเมือกเยิ้ม ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 โดยลักษณะโคโลนีของ AP-1 จะไม่เรียบจะมีหลุม ๆ คล้ายกับมีการสร้างก๊าซขณะเจริญ โดยจะมีเมือกใส ใส เยิ้มอยู่รอบ ๆ โคโลนีเดี่ยว ในขณะที่ลักษณะโคโลนีของ AP-3 จะเรียบและชุ่มเยิ้มเท่า ๆ กัน แต่จะไม่มีเมือกใส ใส เยิ้มแยกออกมา เมื่อนำ AP-1 และ AP-3 ไปย้อมแกรมพบว่า ทั้ง AP-1 และ AP-3 ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม (cocci) มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบ tetrad มีขนาดเซลล์ 0.8-1.2 x 1.0-1.4 ไมโครเมตร สามารถสร้างเอนไซม์ Pseudocatalase ได้ ไม่รีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) สามารถย่อยสลายอาร์จินีนและเอสคูลินได้ (hydrolysis of arginine and esculin) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 4.0, 6.0 และ 8.0 แต่ไม่เจริญเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมี pH 8.5 โดยมีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4.0, 6.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ แต่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไม่เจริญ เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 9 เชื้อนี้จัดเป็น *Pediococcus pentosaceus* (Balows et al., 1992)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus*

ลักษณะ	รหัสเชื้อ				
	AP-1	AP-2	AP-3	AP-4	AP-5
Gram reaction	+				
Cell form	Cocci				
Cell arrangement	Tetrad				
Cell size (µm)	0.8-1.2	1.0-1.4	0.8-1.0	0.8-1.2	1.0-1.2
Pseudocatalase	+	+	+	+	+
Nitrate reduction (aerobic)	-	-	-	-	-
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+
Hydrolysis of esculin	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+
pH 8.5	-	-	-	-	-
Growth in NaCl 4.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 6.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 8.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 10.0 %	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	+	+	+
Growth at 45°C	-	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

+ = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่าทั้ง AP-1 และ AP-3 สามารถสร้างกรดได้ เมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น ไรโบส (ribose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) เมลิไซโทส (melizitose) เมลิไบโอส (melibiose) ซาลิซิน(salicin) ราฟฟิโนส (raffinose) ฟรุคโตส (fructose) แมนโนส (mannose) แต่ไม่สามารถสร้างกรดได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น อะลาบินอส (arabinose) ไกไซโลส (xylose) แมนนิทอล (mannitol) แรมโนส (Rhamnose) เซลโลไบโอส (Cellobiose) ซอร์บิตอล (sorbitol) ซอร์โบส (sorbose) ตรีฮาโลส (trehalose) ดังแสดงในตารางที่ 10



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus*

ชนิดน้ำตาล	รหัสเชื้อ				
	AP-1	AP-2	AP-3	AP-4	AP-5
Ribose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+
Fructose	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = สามารถสร้างกรดได้ - = ไม่สามารถสร้างกรดได้

จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ LE11-1, LE11-2, LE11-3, LE12-1, LE12-2, LE13-1, LE13-2, LE14-2, LE15-4, LE16-1, LE16-2, LE16-4, LE21-1, LE21-2, LE21-3 และ LE22-1 เมื่อนำไปย้อมแกรมพบว่า ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม (cocci) มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบสาย ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายอาร์จีนีน แต่สามารถย่อยสลาย เอสคูลิน สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 8.0 โดยมีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4.0 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยมีความสามารถในการเจริญในน้ำตาลแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 12 เชื้อนี้จัดเป็น *Leuconostoc mesenteroides* (Balows et al., 1992)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*

ลักษณะ	รหัสเชื้อ				
	LE11-1	LE11-2	LE11-3	LE12-1	LE12-2
Gram reaction	+				
Cell form	Cocci				
Cell arrangement	Chain				
Hydrolysis of arginine	-	-	-	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	-	-	-	-	-
pH 4.5	-	-	-	-	-
pH 8.0	+	+	+	+	+
pH 8.5	-	-	-	-	-
Growth in NaCl 4.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 6.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 8.0 %	-	-	-	-	-
NaCl 10.0 %	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

+ = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 (ต่อ) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*

ลักษณะ	รหัสเชื้อ				
	LE13-1	LE13-2	LE14-2	LE15-4	LE16-1
Gram reaction	+				
Cell form	Cocci				
Cell arrangement	Chain				
Hydrolysis of arginine	-	-	-	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	-	-	-	-	-
pH 4.5	-	-	-	-	-
pH 8.0	+	+	+	+	+
pH 8.5	-	-	-	-	-
Growth in NaCl 4.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 6.0 %	+	+	+	+	+
NaCl 8.0 %	-	-	-	-	-
NaCl 10.0 %	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

+ = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 (ต่อ) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*

ลักษณะ	รหัสเชื้อ					
	LE16-2	LE16-4	LE21-2	LE21-2	LE21-3	LE22-1
Gram reaction	+					
Cell form	Cocci					
Cell arrangement	Chain					
Hydrolysis of arginine	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	-	-	-	-	-	-
pH 4.5	-	-	-	-	-	-
pH 8.0	+	+	+	+	+	+
pH 8.5	-	-	-	-	-	-
Growth in NaCl 4.0 %	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.0 %	+	+	+	+	+	+
NaCl 8.0 %	-	-	-	-	-	-
NaCl 10.0 %	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*

ชนิดน้ำตาล	รหัสเชื้อ				
	LE11-1	LE11-2	LE11-3	LE12-1	LE12-2
Ribose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+
Sorbose	+	+	+	+	+
Mannose	+	-	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = สามารถสร้างกรดได้ - = ไม่สามารถสร้างกรดได้

ตารางที่ 12 (ต่อ) การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*

ชนิดน้ำตาล	รหัสเชื้อ				
	LE13-1	LE13-2	LE14-2	LE15-4	LE16-1
Ribose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	-	+
Xylose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-
Maltose	-	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+
Sorbose	+	+	+	+	+
Mannose	+	-	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = สามารถสร้างกรดได้ - = ไม่สามารถสร้างกรดได้

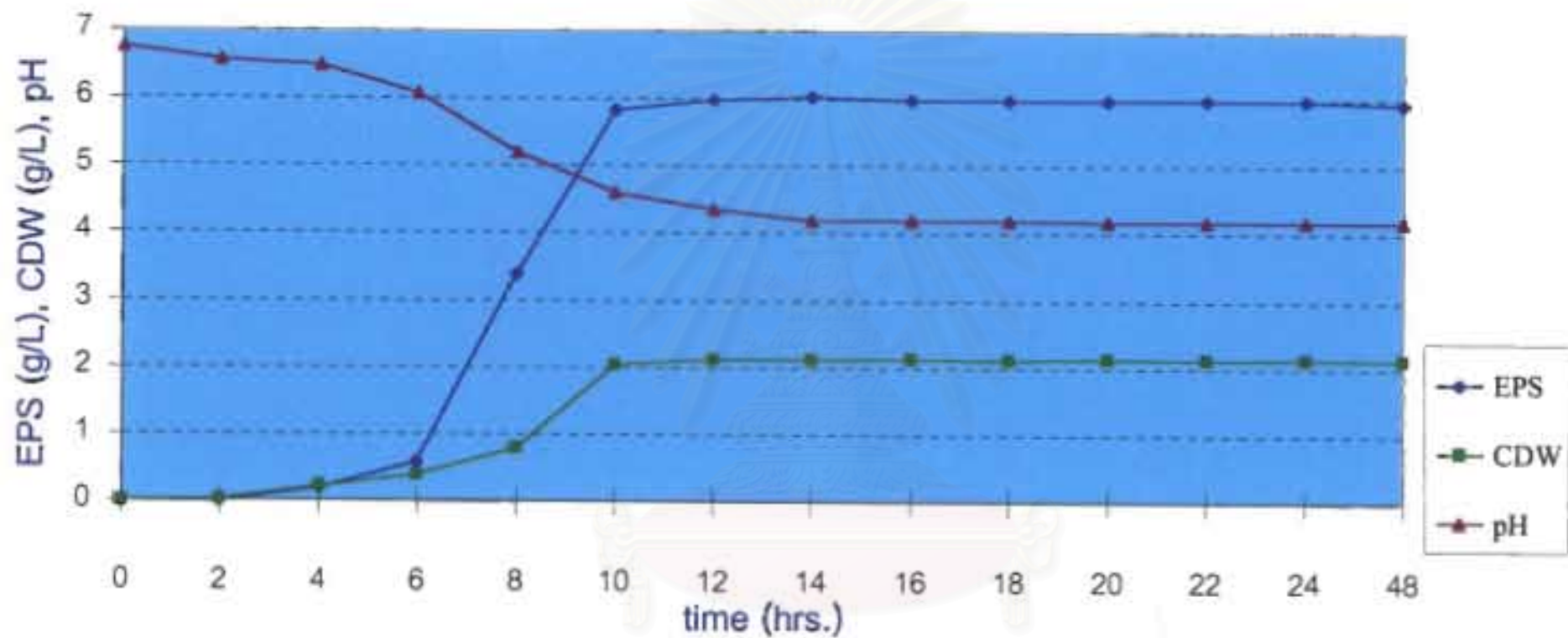
ตารางที่ 12 (ต่อ) การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*

ชนิดน้ำตาล	รหัสเชื้อ					
	LE16-2	LE16-4	LE21-2	LE21-2	LE21-3	LE22-1
Ribose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+
Sorbose	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+

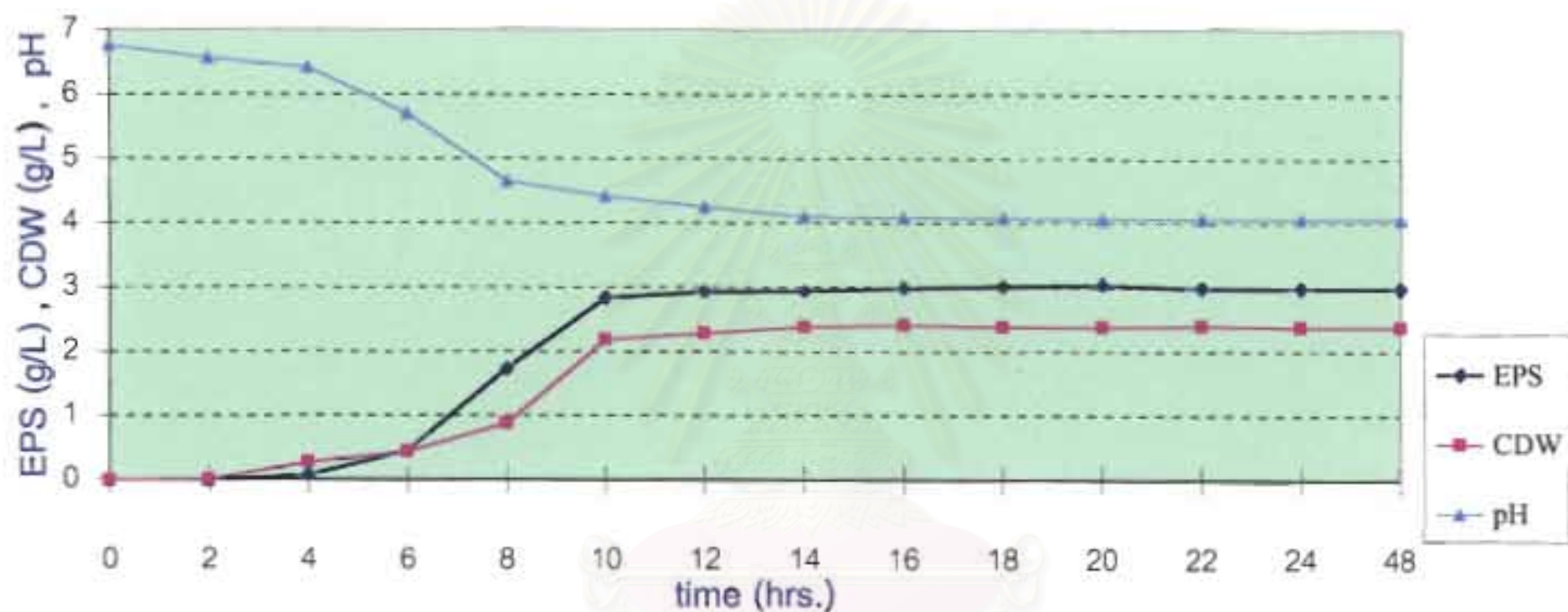
หมายเหตุ + = สามารถสร้างกรดได้ - = ไม่สามารถสร้างกรดได้

5. ผลการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิต EPS

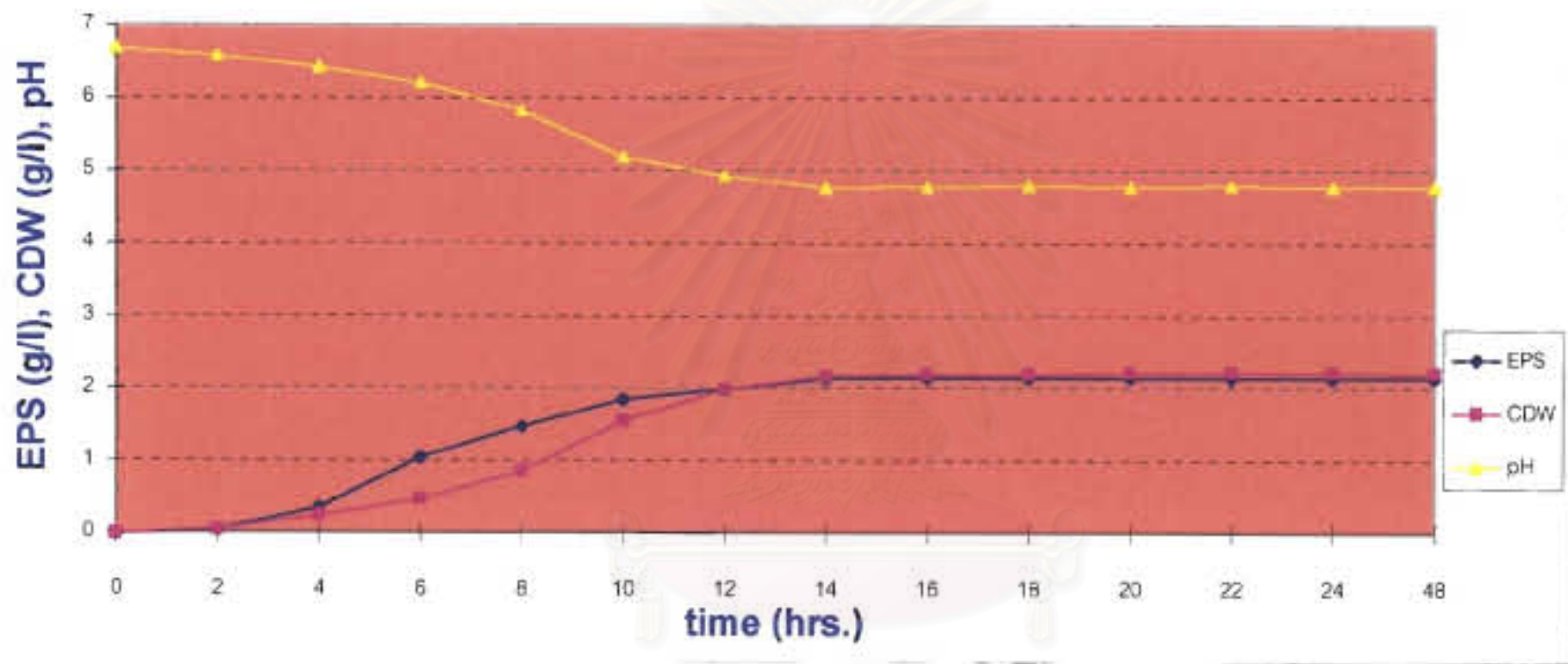
นำเชื้อที่มีความสามารถสร้าง EPS ในอาหารเหลวสูงมาศึกษาลักษณะการเจริญได้จากข้อ 3 ได้แก่ เชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 โดยเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบมี pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตโดยสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ pH ปริมาณเซลล์ และปริมาณ EPS ดังแสดงในรูปที่ 5-8 โดยเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ Stationary phase ในเวลา 10 , 10, 12 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ การผลิต EPS เกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กับ การเจริญและหยุดการผลิตเมื่อมีการหยุดการเจริญ โดย pH จะลดลงจาก 6.5 ไปเป็น 4.21, 4.25, 4.47 และ 4.93 ตามลำดับ



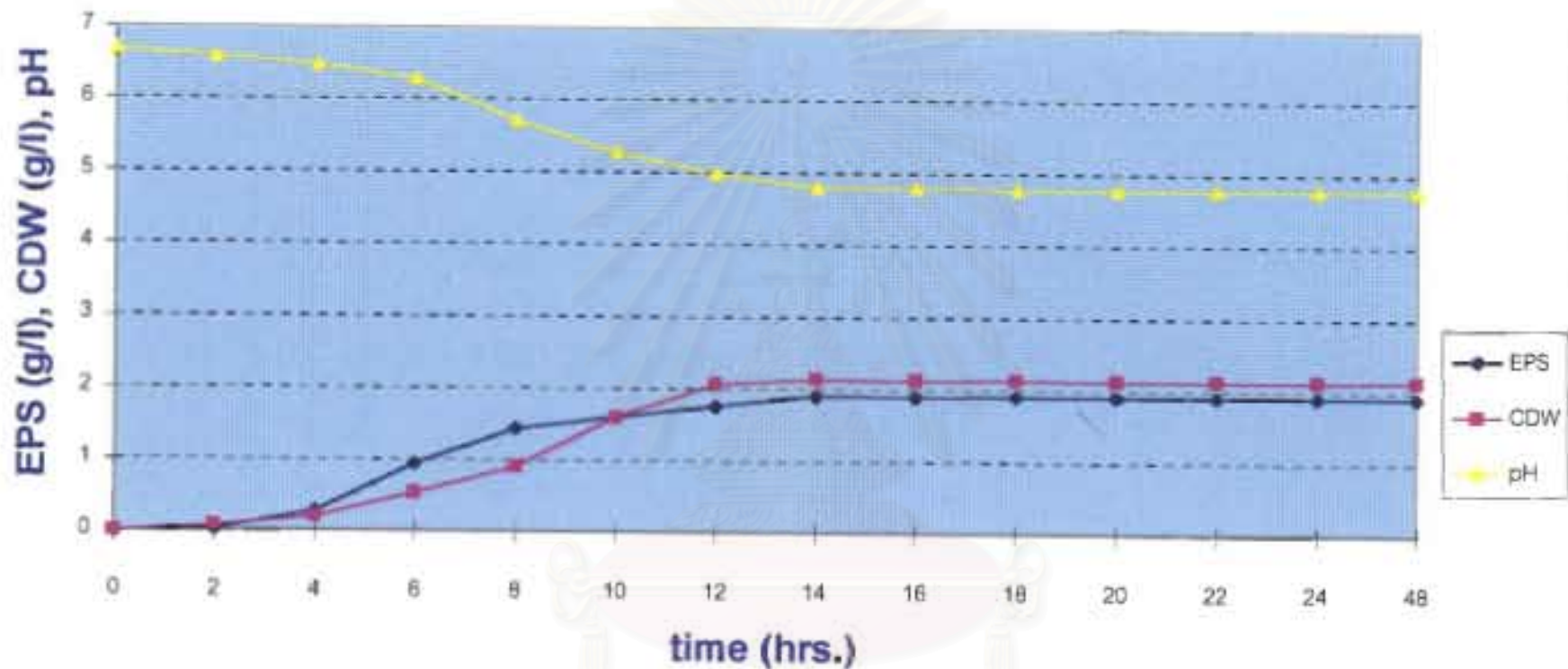
รูปที่ 5 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ AP-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ AP-3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ LE13-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้าง EPS และน้ำหนักเซลล์ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 8. กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ LE13-2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสังเคราะห์ EPS และน้ำหนักเซลล์ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ปกติอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

6. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

6.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร

6.1.1 ผลการแปรปริมาณน้ำตาล

เนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง EPS ได้สูงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงทำการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครส เป็น 11 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นก็จะมีผลทำให้การผลิต EPS สูงขึ้นด้วย โดยพบว่าที่ปริมาณน้ำตาลซูโครส 30 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ผลิต EPS สูงสุด คือ 25.06 กรัมต่อลิตร, 19.69 กรัมต่อลิตร, 9.46 กรัมต่อลิตร และ 6.87 กรัมต่อลิตร

ในเชื้อ AP-1 พบว่าปริมาณน้ำตาล 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้นสูงที่สุด คือ 4.52 แต่เนื่องจากปริมาณ EPS ที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ คือ 2.26 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครส 4.0 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไป เนื่องจากให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้นสูงถัดมา คือ 3.9 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิต EPS ได้สูงถึง 15.78 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 13

ในเชื้อ AP-3 พบว่าปริมาณน้ำตาล 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้นสูง คือ 4.5 และ 1.43 ตามลำดับ แต่เนื่องจากปริมาณ EPS ที่ผลิตได้จะค่อนข้างต่ำ คือ 0.835 กรัมต่อลิตร และ 1.34 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงพิจารณาที่จะเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครส 10.0 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไป ซึ่งจะทำให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้นสูงถัดมาคือ 1.34 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิต EPS ได้สูงถึง 13.36 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 14

ส่วนในเชื้อ LE13-1 พบว่าปริมาณน้ำตาล 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้นสูง คือ 2.14 แต่เนื่องจากปริมาณ EPS ที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ คือ 1.07 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงพิจารณาที่จะเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครส 8.0 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไป ซึ่งจะทำให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้น 1.08 และสามารถผลิต EPS ได้สูงถึง 6.86 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 15

ส่วนในเชื้อ LE13-2 พบว่าปริมาณน้ำตาล 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้ ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งต้นสูง คือ 2.20 แต่เนื่องจากปริมาณ EPS ที่ผลิตได้ ค่อนข้างต่ำ คือ 1.10 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงพิจารณาที่จะเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครส 6.0 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไป ซึ่งจะทำให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 0.97 และสามารถผลิต EPS ได้สูงถึง 5.80 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 13 แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ AP-1 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง

ปริมาณ น้ำตาล (%)	ค่าเฉลี่ย			
	pH	CDW (g/l)	EPS (g/l)	EPS/Sugar (g/g)
0	6.46 ^a ± 0.05	0.77 ^f ± 0.06	0.00 ^j ± 0.00	0.00 ^k
0.5	5.21 ^b ± 0.10	1.79 ^c ± 0.16	2.26 ⁱ ± 0.20	4.52 ^a
1.0	4.73 ^c ± 0.02	2.17 ^b ± 0.25	3.48 ^h ± 0.35	3.48 ^c
2.0	4.20 ^d ± 0.05	2.21 ^a ± 0.15	6.00 ^g ± 0.45	3.00 ^d
4.0	3.94 ^e ± 0.05	1.73 ^c ± 0.15	15.78 ^f ± 0.70	3.90 ^b
6.0	3.94 ^e ± 0.05	1.73 ^c ± 0.20	16.12 ^e ± 0.58	2.69 ^e
8.0	3.91 ^f ± 0.10	1.69 ^d ± 0.05	17.23 ^d ± 0.75	2.15 ^f
10.0	3.91 ^f ± 0.05	1.65 ^d ± 0.10	19.60 ^c ± 0.50	1.96 ^g
15.0	3.90 ^f ± 0.05	1.55 ^e ± 0.12	19.97 ^c ± 0.95	1.33 ^h
20.0	3.91 ^f ± 0.05	1.50 ^e ± 0.10	20.28 ^b ± 1.12	1.02 ⁱ
30.0	3.97 ^e ± 0.20	0.79 ^f ± 0.05	25.06 ^a ± 1.52	0.84 ^j

a,b,c,d,.....ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

ตารางที่ 14 แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ AP-3 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาล (%)	ค่าเฉลี่ย			
	pH	CDW (g/l)	EPS (g/l)	EPS/sugar (g/g)
0	6.44 ^a ± 0.05	1.06 ^g ± 0.10	0.00 ^k ± 0.00	0.00 ^l
0.5	5.15 ^b ± 0.10	1.89 ^d ± 0.15	0.84 ^j ± 0.05	4.5 ^a
1.0	4.69 ^c ± 0.05	2.28 ^b ± 0.20	1.34 ⁱ ± 0.12	1.43 ^b
2.0	4.26 ^d ± 0.05	2.415 ^a ± 0.22	2.59 ^h ± 0.24	1.25 ^d
4.0	3.96 ^e ± 0.02	2.31 ^b ± 0.18	4.67 ^g ± 0.44	1.17 ^e
6.0	4.02 ^e ± 0.01	2.18 ^c ± 0.21	6.99 ^f ± 0.52	1.17 ^e
8.0	4.05 ^e ± 0.05	1.93 ^d ± 0.15	10.01 ^e ± 0.85	1.25 ^d
10.0	4.07 ^e ± 0.01	1.64 ^e ± 0.10	13.36 ^d ± 1.12	1.34 ^c
15.0	4.06 ^e ± 0.05	1.55 ^f ± 0.12	15.78 ^c ± 1.23	1.05 ^f
20.0	4.04 ^e ± 0.10	1.50 ^f ± 0.10	17.295 ^b ± 0.78	0.86 ^g
30.0	4.11 ^e ± 0.05	0.79 ^h ± 0.05	19.69 ^a ± 1.45	0.66 ^h

a,b,c,d,.....ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ LE13-1 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาล (%)	ค่าเฉลี่ย			
	pH	CDW (g/l)	EPS (g/l)	EPS/Sugar (g/g)
0	6.65 ^a ± 0.15	0.44 ^f ± 0.55	0.05 ^k ± 0.00	0.00 ^j
0.5	5.44 ^b ± 0.50	1.67 ^c ± 0.50	1.07 ^j ± 0.20	2.14 ^a
1.0	5.18 ^c ± 0.22	1.75 ^c ± 0.30	1.66 ⁱ ± 0.35	1.66 ^b
2.0	4.45 ^d ± 0.05	2.11 ^a ± 0.05	2.16 ^h ± 0.45	0.98 ^d
4.0	4.40 ^e ± 0.15	1.70 ^c ± 0.10	2.95 ^g ± 0.70	0.73 ^f
6.0	4.44 ^d ± 0.25	1.68 ^c ± 0.25	4.83 ^f ± 0.58	0.80 ^e
8.0	4.43 ^d ± 0.05	1.66 ^c ± 0.15	6.86 ^e ± 0.75	1.08 ^c
10.0	4.40 ^e ± 0.10	1.70 ^c ± 0.20	8.22 ^d ± 0.50	0.82 ^e
15.0	4.38 ^e ± 0.10	1.70 ^c ± 0.26	9.20 ^c ± 0.95	0.61 ^g
20.0	4.40 ^f ± 0.55	1.51 ^d ± 0.15	9.33 ^b ± 0.12	0.47 ^h
30.0	4.41 ^f ± 0.25	0.86 ^e ± 0.10	9.46 ^a ± 0.52	0.32 ⁱ

a,b,c,d,.....ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถวเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงผลของการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร MRS ต่อการสร้าง EPS ของเชื้อ LE13-2 เมื่อทำการบ่มครบ 72 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาล (%)	ค่าเฉลี่ย			
	pH	CDW (g/l)	EPS (g/l)	EPS/sugar (g/g)
0	6.53 ^a ± 0.15	0.46 ^d ± 0.15	0.00 ^k ± 0.00	0.00 ^j
0.5	5.39 ^b ± 0.20	1.71 ^b ± 0.25	1.10 ^j ± 0.15	2.20 ^a
1.0	5.15 ^c ± 0.15	1.88 ^b ± 0.20	1.42 ^j ± 0.22	1.42 ^b
2.0	4.95 ^d ± 0.15	2.01 ^a ± 0.22	1.90 ^h ± 0.15	0.95 ^c
4.0	4.66 ^e ± 0.20	1.59 ^c ± 0.28	3.63 ^g ± 0.44	0.90 ^c
6.0	4.41 ^f ± 0.15	1.60 ^c ± 0.45	5.80 ^f ± 0.56	0.97 ^c
8.0	4.40 ^f ± 0.05	1.65 ^c ± 0.20	6.08 ^e ± 0.85	0.76 ^d
10.0	4.42 ^f ± 0.10	1.77 ^b ± 0.10	6.56 ^d ± 0.55	0.57 ^e
15.0	4.40 ^f ± 0.05	1.76 ^b ± 0.12	6.65 ^c ± 0.45	0.44 ^f
20.0	4.40 ^f ± 0.20	1.56 ^c ± 0.20	6.68 ^b ± 0.55	0.33 ^g
30.0	4.40 ^f ± 0.26	0.98 ^h ± 0.15	6.87 ^a ± 0.25	0.23 ^h

a,b,c,d,.....ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถวแตกต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.1.2 ผลการแปรปริมาณไนโตรเจน

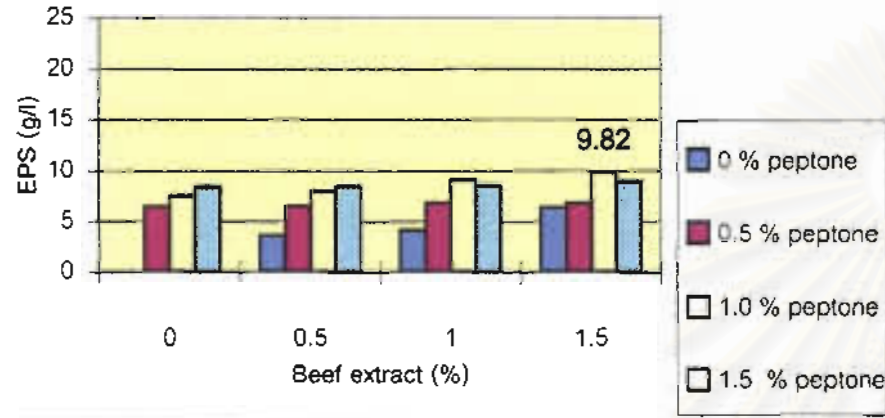
ได้แปรปริมาณ Yeast extract เป็น 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ AP-1 และ AP-3 ทำการแปร Peptone และ Beef extract แปรเป็น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ในเชื้อ LE13-1 และ LE13-2 ทำการแปร Peptone และ Beef extract แปรเป็น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ปริมาณ EPS ที่ได้จากสภาวะต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 9 และ 12

จากการแปรปริมาณของไนโตรเจนแต่ละชนิด คือ Yeast extract , Peptone และ Beef extract พบว่าไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดมีผลต่อการผลิต EPS อย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้ AP-1 ผลิต EPS ได้สูงที่สุด คือ ปริมาณ Yeast extract : Peptone : Beef extract เท่ากับ 1.0 : 1.5 : 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผลิตได้ 15.265 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้ AP-3 ผลิต EPS ได้สูงที่สุด คือ Yeast extract : Peptone : Beef extract เท่ากับ 0.5 : 1.5 : 1.5 โดยผลิตได้ 15.68 กรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้ LE13-1 ผลิต EPS ได้สูงที่สุด คือ Yeast extract : Peptone : Beef extract เป็น 0.25 , 1.0 , 1.0 โดยผลิตได้ 9.16 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้ LE13-2 ผลิต EPS ได้สูงที่สุด คือ Yeast extract, Peptone , Beef extract เป็น 0.25 , 2.0 , 2.0 โดยผลิตได้ 6.32 กรัมต่อลิตร

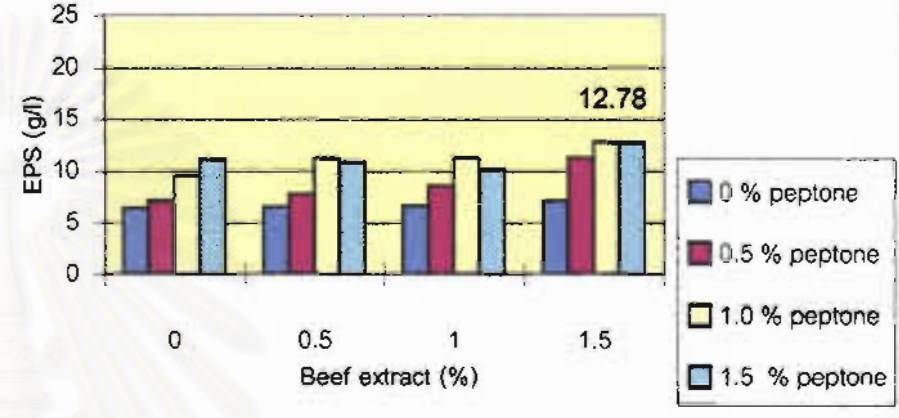
แต่เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นสำหรับเชื้อ AP-1 และ LE13-2 จึงเลือกใช้ระดับที่ต่ำลงมาแต่ให้ปริมาณ EPS สูงเช่นเดียวกัน คือ Yeast extract : Peptone : Beef extract เท่ากับ 0.5 : 1.0 : 1.0 และ 0.25 : 2.0 : 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยผลิตได้ 15.11 กรัมต่อลิตร และ 6.32 กรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

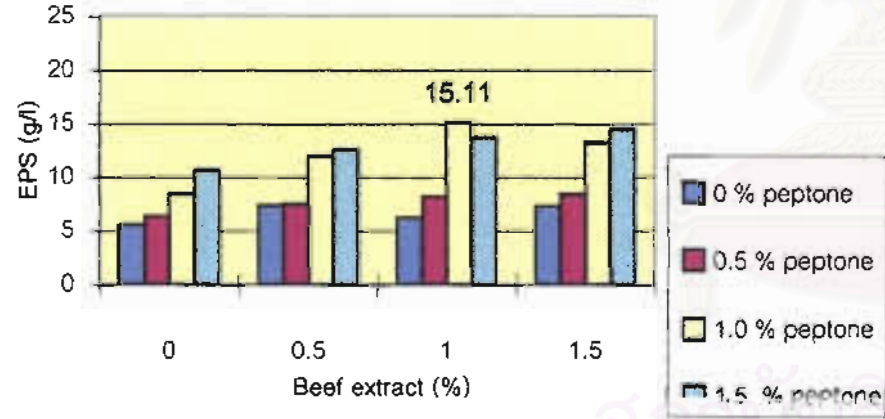
AP-1 : yeast extract = 0 %



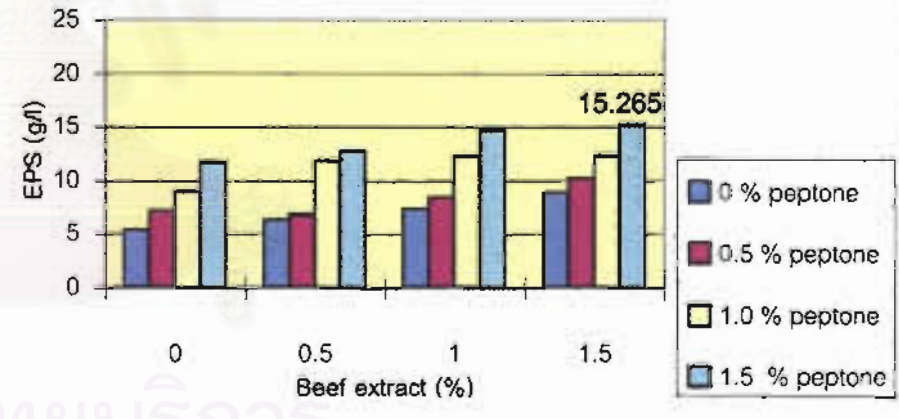
AP-1 : Yeast extract = 0.25 %



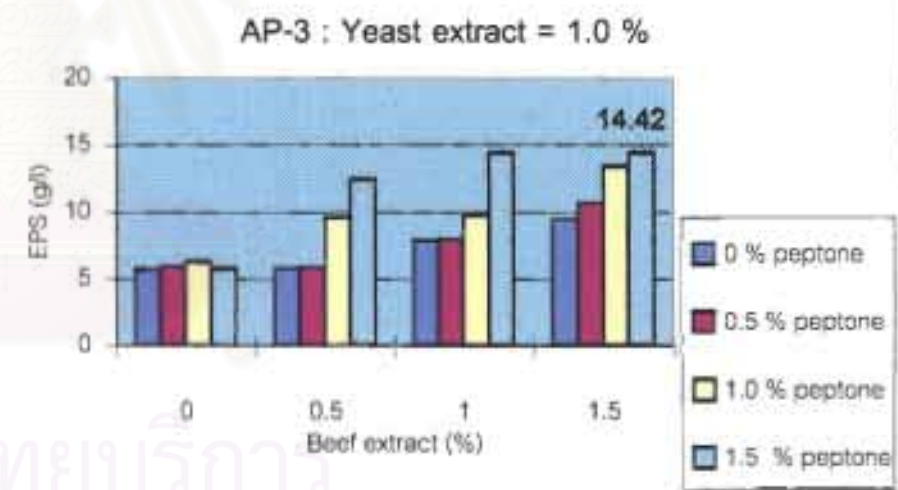
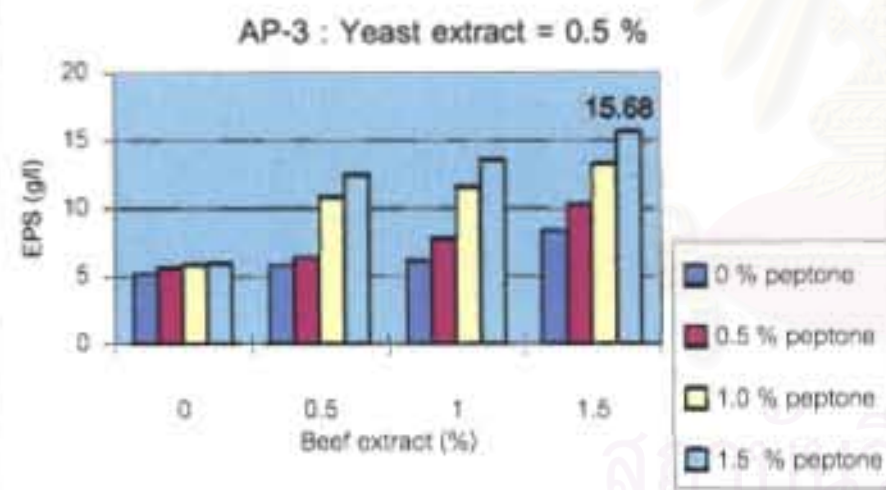
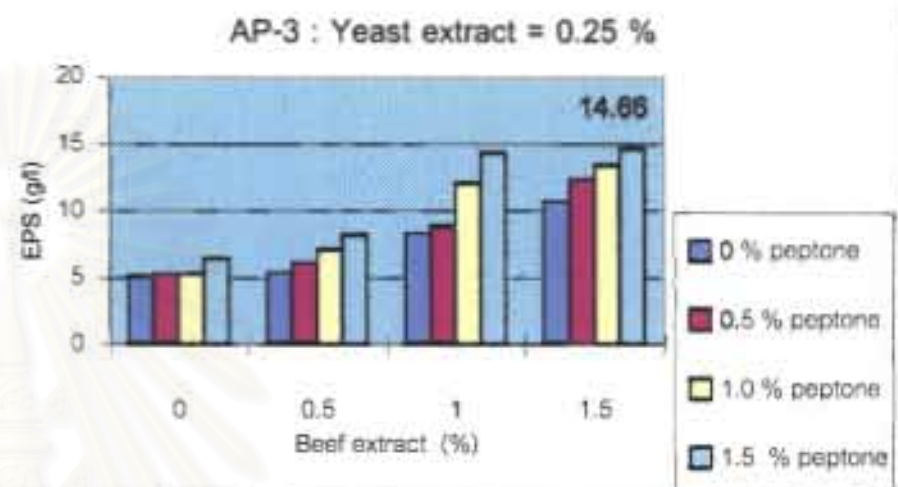
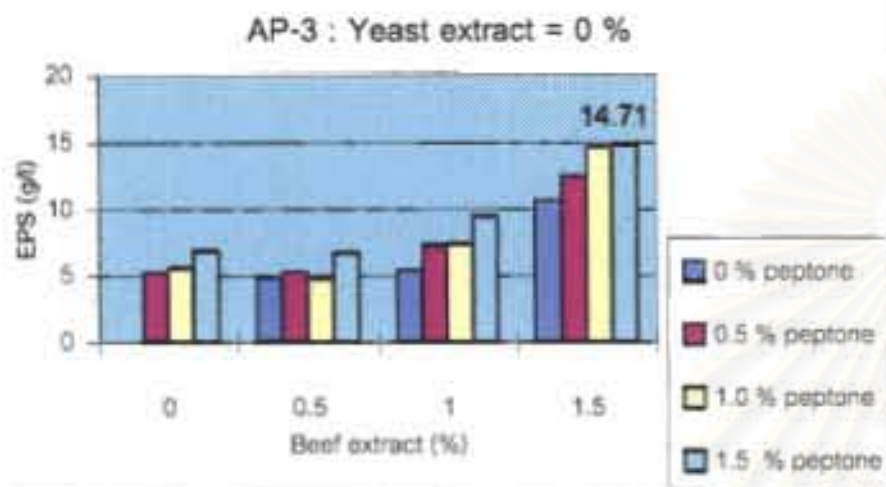
AP-1 : Yeast extract = 0.5 %



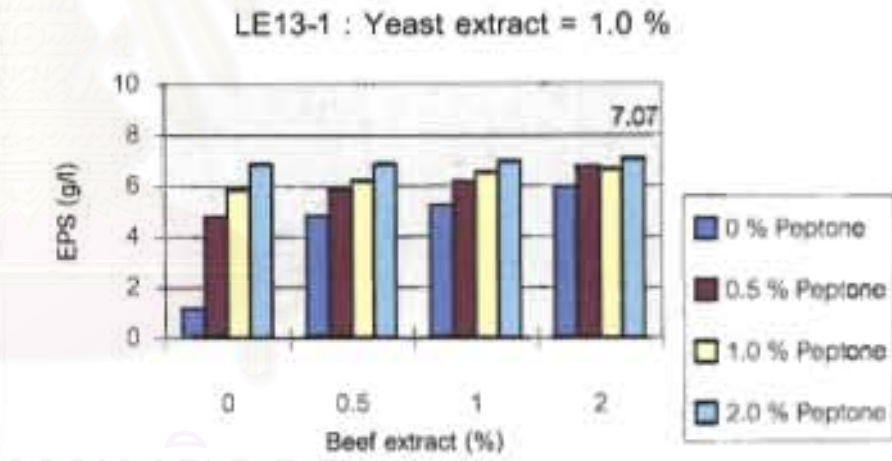
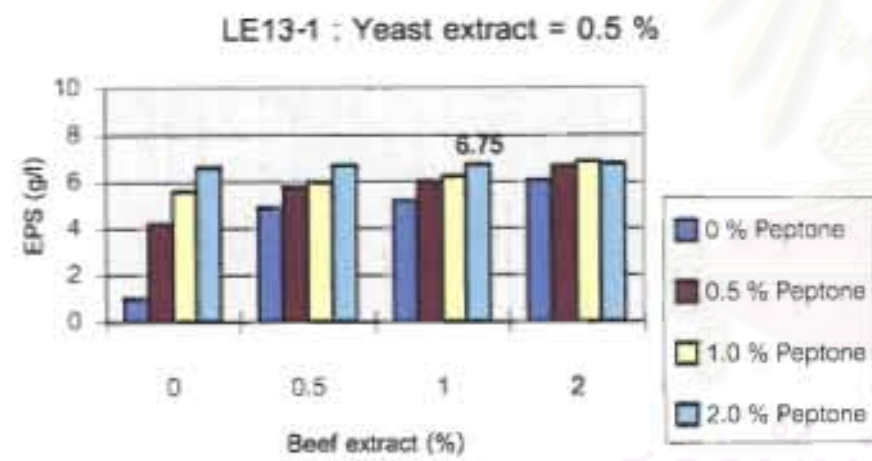
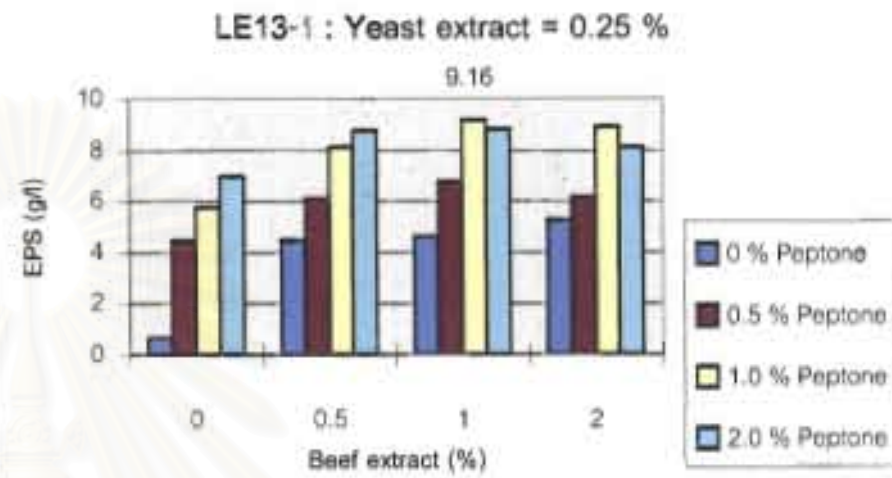
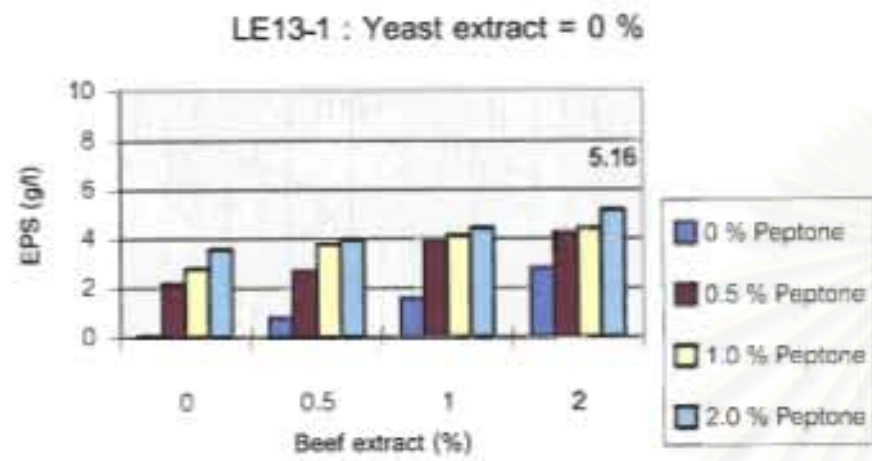
AP-1 : Yeast extract = 1.0 %



รูปที่ 9 กราฟแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-1

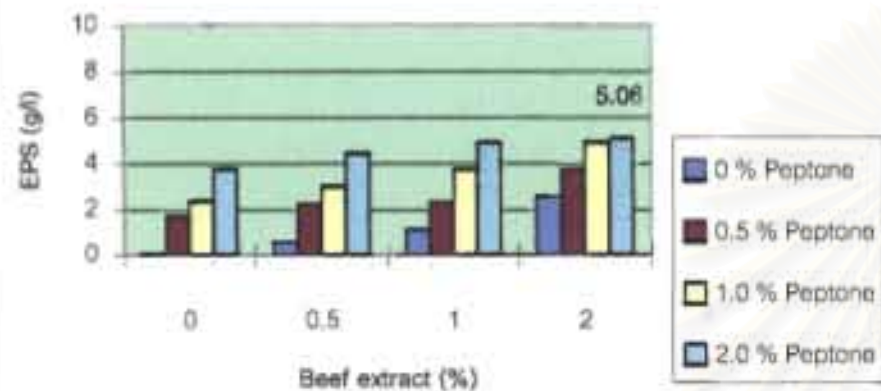


รูปที่ 10 ภาพแสดงผลของปริมาณในโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-3

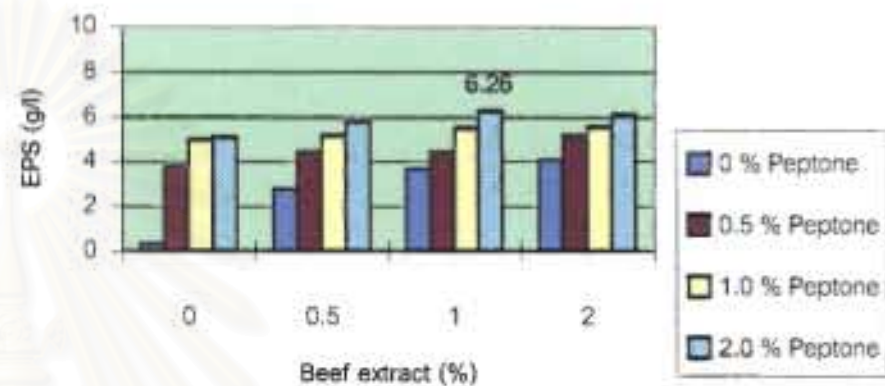


รูปที่ 11 กราฟแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-1

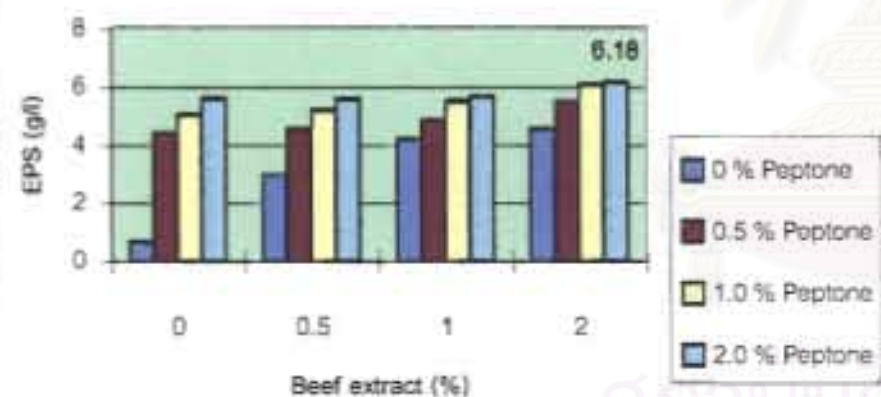
LE13.2 : Yeast extract = 0 %



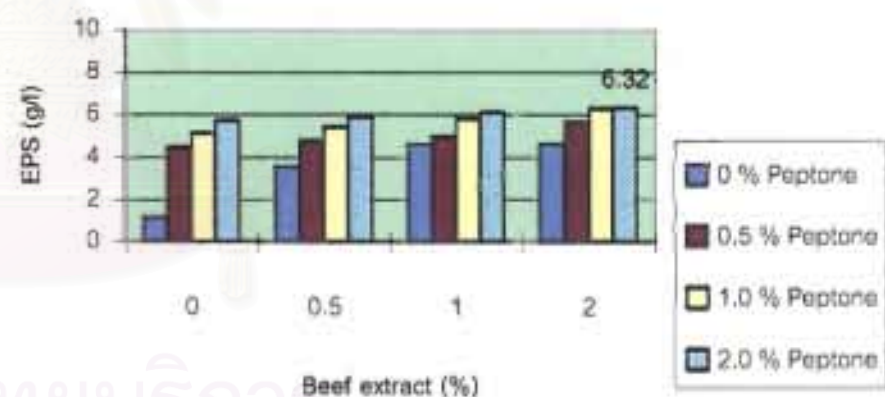
LE13.2 : Yeast extract = 0.25 %



LE13.2 : Yeast extract = 0.5 %



LE13.2 : Yeast extract = 1.0 %



รูปที่ 12 ภาพแสดงผลของปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Peptone และ Beef extract ต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-2

6.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

6.2.1 ผลการศึกษาผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่า

เมื่อแปรสภาวะโดยแปรอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่า พบว่าอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารไม่มีผลต่อการผลิต EPS สำหรับเชื้อ AP-1 และ AP-3 (ตารางที่ 17-18) สำหรับ LE13-1 และ LE13-2 พบว่าการไม่เขย่าจะทำให้การผลิต EPS สูงกว่าเล็กน้อย แต่เป็นการแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 19 - 20)

ตารางที่ 17 แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-1

ภาวะ	ระดับอาหาร	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
เขย่า (150 rpm)	25	15.11 ^b \pm 0.50
	50	15.61 ^b \pm 0.77
	75	15.68 ^b \pm 1.21
	100	15.72 ^b \pm 0.18
	125	15.82 ^b \pm 0.15
	150	15.79 ^b \pm 0.21
ไม่เขย่า	25	16.55 ^a \pm 0.15
	50	16.62 ^a \pm 0.37
	75	16.72 ^a \pm 0.12
	100	16.67 ^a \pm 0.28
	125	16.65 ^a \pm 0.50
	150	16.71 ^a \pm 0.27

a,b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 18 แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-3

ภาวะ	ระดับอาหาร	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
เขย่า (150 rpm)	25	18.07 ^b \pm 0.05
	50	18.15 ^b \pm 0.17
	75	18.16 ^b \pm 0.21
	100	18.25 ^b \pm 0.16
	125	18.31 ^b \pm 0.08
	150	18.30 ^b \pm 0.10
ไม่เขย่า	25	18.71 ^a \pm 0.08
	50	18.63 ^a \pm 0.37
	75	18.77 ^a \pm 0.11
	100	18.75 ^a \pm 0.05
	125	18.69 ^a \pm 0.18
	150	18.71 ^a \pm 0.27

a,b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อ ปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-1

ภาวะ	ระดับอาหาร	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
เขย่า (150 rpm)	25	7.08 ^b \pm 0.20
	50	7.16 ^b \pm 0.55
	75	7.22 ^b \pm 0.36
	100	7.25 ^b \pm 0.17
	125	7.26 ^b \pm 0.12
	150	7.20 ^b \pm 0.41
ไม่เขย่า	25	9.16 ^a \pm 0.12
	50	9.22 ^a \pm 0.37
	75	9.15 ^a \pm 0.32
	100	9.24 ^a \pm 0.28
	125	9.18 ^a \pm 0.22
	150	9.21 ^a \pm 0.37

a,b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 แสดงผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-2

ภาวะ	ระดับอาหาร	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
เขย่า (150 rpm)	25	5.08 ^b \pm 0.05
	50	5.10 ^b \pm 0.27
	75	5.00 ^b \pm 0.25
	100	5.25 ^b \pm 0.16
	125	5.31 ^b \pm 0.38
	150	5.26 ^b \pm 0.11
ไม่เขย่า	25	6.26 ^a \pm 0.18
	50	6.30 ^a \pm 0.17
	75	6.25 ^a \pm 0.22
	100	6.31 ^a \pm 0.15
	125	6.28 ^a \pm 0.21
	150	6.33 ^a \pm 0.17

a,b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

6.2.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิ

เมื่อแปรสภาวะโดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก พบว่า อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิต EPS ของทั้ง AP-1, AP-3, LE 13-1 และ LE13-2 โดยผลิตได้ 16.32 กรัมต่อลิตร, 18.56 กรัมต่อลิตร, 9.32 กรัมต่อลิตร และ 6.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าที่อุณหภูมิสูงจะทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิต EPS เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิต่ำ คือ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทั้ง AP-1, AP-3, LE 13-1 และ LE13-2 ผลิต EPS ได้ต่ำลงเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 21-24

ตารางที่ 21 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-1

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	pH	CDW (g/L)	EPS (g/L)
20	4.21 ^a ± 0.02	1.881 ^b ± 0.102	10.18 ^c ± 0.52
30	3.95 ^b ± 0.05	2.102 ^a ± 0.025	16.32 ^a ± 0.48
37	4.05 ^b ± 0.01	1.918 ^b ± 0.056	13.15 ^b ± 0.23
40	5.26 ^c ± 0.025	1.014 ^c ± 0.095	5.11 ^d ± 0.21

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

ตารางที่ 22 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-3

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	pH	CDW (g/L)	EPS (g/L)
20	4.56 ^b ± 0.02	1.512 ^c ± 0.005	12.64 ^c ± 0.20
30	4.05 ^c ± 0.01	1.928 ^a ± 0.010	18.56 ^a ± 0.16
37	4.11 ^c ± 0.04	1.886 ^b ± 0.015	14.28 ^b ± 0.30
40	5.66 ^a ± 0.05	0.891 ^b ± 0.035	3.78 ^d ± 0.12

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ AP-1

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	pH	CDW (g/L)	EPS (g/L)
20	5.32 ^a ± 0.05	1.121 ^b ± 0.203	6.51 ^c ± 0.23
30	4.43 ^b ± 0.02	1.720 ^a ± 0.025	9.32 ^a ± 0.18
37	4.53 ^b ± 0.10	1.321 ^b ± 0.050	5.12 ^b ± 0.28
40	5.82 ^c ± 0.05	0.905 ^c ± 0.095	3.11 ^d ± 0.14

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 24 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต EPS ของเชื้อ LE13-2

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	pH	CDW (g/L)	EPS (g/L)
20	4.56 ^b ± 0.02	1.225 ^c ± 0.005	4.16 ^c ± 0.25
30	4.42 ^c ± 0.01	1.617 ^a ± 0.025	6.35 ^a ± 0.21
37	5.05 ^c ± 0.02	1.175 ^b ± 0.015	5.56 ^b ± 0.35
40	5.96 ^a ± 0.05	0.791 ^b ± 0.035	2.21 ^d ± 0.22

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

7. ผลการทำให้ EPS บริสุทธิ์บางส่วน (EPS Partial purification)

เมื่อคัดเลือกเชื้อและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS ได้แล้วนำมาทำการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณมาก พบว่า EPS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer พบว่า มีลักษณะผงละเอียด จะมีสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 13-14



รูปที่ 13 แสดงลักษณะ EPS ของ AP-1 ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer



รูปที่ 14 แสดงลักษณะ EPS ของ AP-3 ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer

8. ผลการวิเคราะห์ผลการศึกษาคณสมบัติของ EPS

น้ำ EPS ที่ผ่านการผลิตและทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 7 มาศึกษาคณสมบัติประจุ (ดังแสดงในภาคผนวก ค. ข้อที่ 1) ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ น้ำหนักโมเลกุล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของ EPS ดังแสดงในตารางที่ 25 พบว่า AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบสูงถึง 98.88, 99.99, 98.64 และ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีชนิดประจุของพอลิแซคคาไรด์เป็นแบบ Neutral มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 90.25, 85.20, 96.64 และ 95.32 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีน 0.10, 0.40, 0.285 และ 0.178 ตามลำดับ สำหรับค่าน้ำหนักโมเลกุลทำการทดสอบเฉพาะ AP-1 และ AP-3 พบว่า AP-1 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 16747 ดาลตัน ส่วน AP-3 มีน้ำหนักโมเลกุล 6×10^6 และ 4×10^7 ดาลตัน

ตารางที่ 25 แสดงคุณสมบัติและองค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

คุณสมบัติของ EPS	EPS ที่ผลิตโดย AP-1	EPS ที่ผลิตโดย AP-3	EPS ที่ผลิตโดย LE13-1	EPS ที่ผลิตโดย LE13-2
คุณสมบัติประจุของ EPS	neutral	neutral	neutral	neutral
ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ	กลูโคส = 98.88 %	กลูโคส = 99.99 %	กลูโคส = 98.64	กลูโคส = 99.33
น้ำหนักโมเลกุลของ EPS (Da)	16747	6×10^6 และ 4×10^7	*	*
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)	90.25	85.20	96.64	95.32
ปริมาณโปรตีน (%)	0.10	0.40	0.285	0.178

หมายเหตุ Da หมายถึง ดาลตัน

* ไม่ได้ทำการทดลอง

9. การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Polysaccharides เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์

อาหาร

9.1 การศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืดของ EPS ในน้ำกลั่นความเข้มข้นต่าง ๆ

เนื่องจากต้องการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ มีอิทธิพลต่อความหนืดของสารละลาย EPS จึงแปรความเข้มข้นของสารละลาย EPS ที่ผลิตได้เพื่อที่จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งก็ได้พิจารณาแล้วว่าน่าจะเปรียบเทียบกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพราะเป็นพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่มีการใช้งานกันอย่างแพร่หลาย และเป็นความหนืดที่ไม่สูงมากจนเกินไป

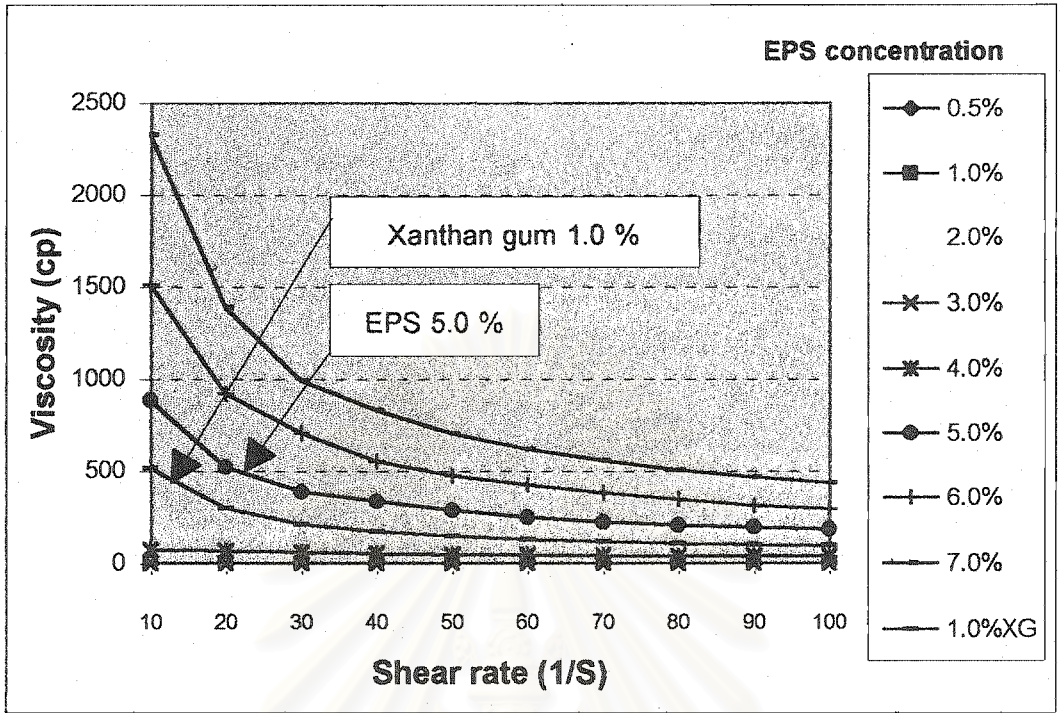
โดยพบว่าความหนืดของสารละลาย EPS จาก AP-1 ที่ใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คือ สารละลาย EPS ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวัดที่ความเร็วรอบ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 รอบต่อนาที มีความหนืดเป็น 397, 264, 218, 170, 153, 143, 130, 121, 108 และ 103 cp. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 15

ส่วนความหนืดของสารละลาย EPS จาก AP-3 ที่ใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คือ สารละลาย EPS ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวัดที่ความเร็วรอบ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 รอบต่อนาที มีความหนืดเป็น 697, 429, 339, 279, 246, 216, 195, 180, 169 และ 156 cp. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16

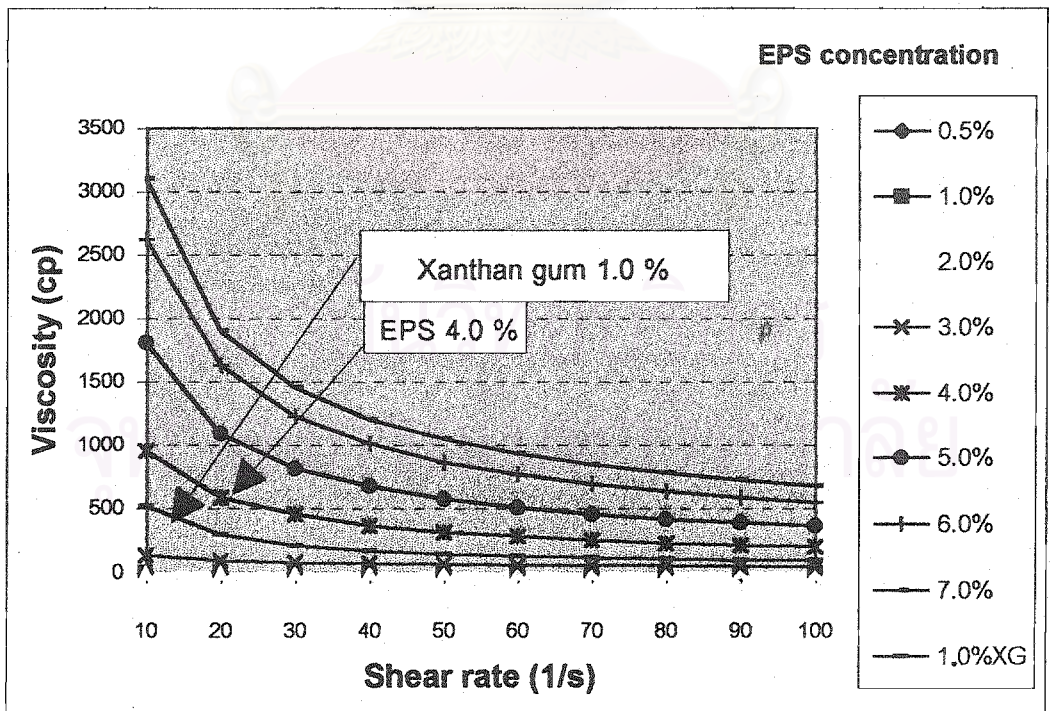
ความหนืดของสารละลาย LE13-1 ที่ใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คือ สารละลาย AP-3 ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวัดที่ความเร็วรอบ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 รอบต่อนาที มีความหนืดเป็น 885, 590, 445, 420, 410, 405, 400, 395, 392 และ 390 cp. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 17

ส่วนความหนืดของสารละลาย EPS จาก LE13-2 ที่ใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คือ สารละลาย LE13-2 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวัดที่ความเร็วรอบ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 รอบต่อนาที มีความหนืดเป็น 449, 267, 186, 149, 135, 116, 96, 90, 88 และ 87 cp. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18

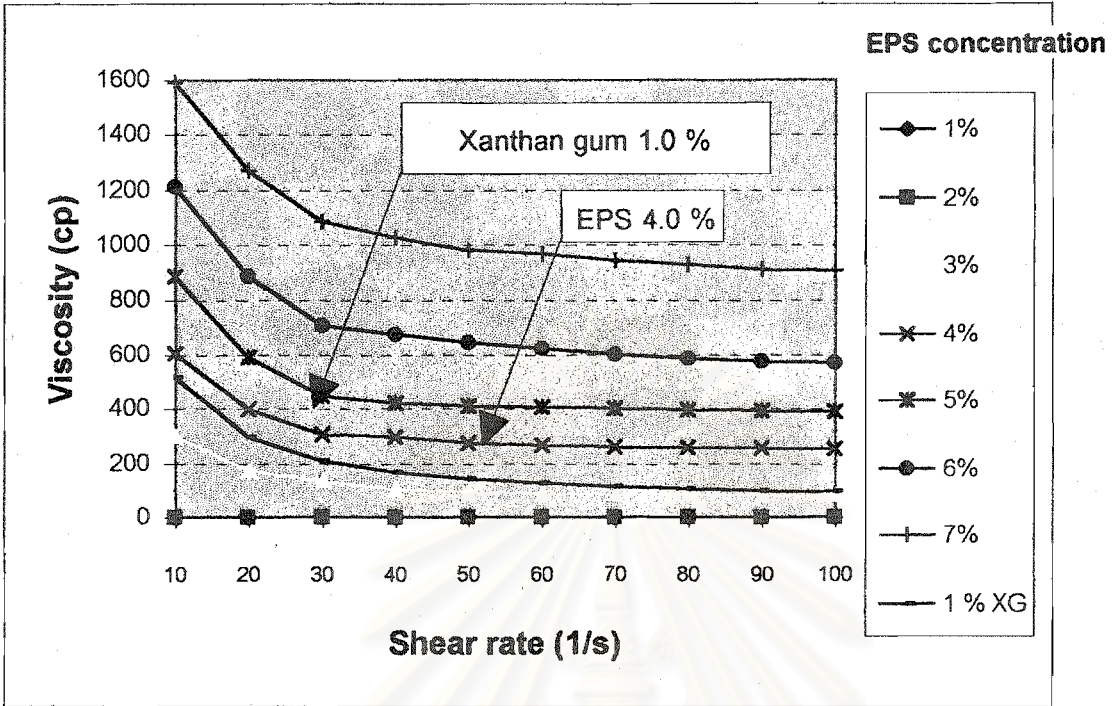
โดยจากกราฟจะเห็นว่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตจากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ความเข้มข้น 5.0, 4.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีความหนืดใกล้เคียงกับ Xanthan gum ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกความเข้มข้นของ EPS แต่ละชนิดมาใช้ในการทำการทดลองต่อไป



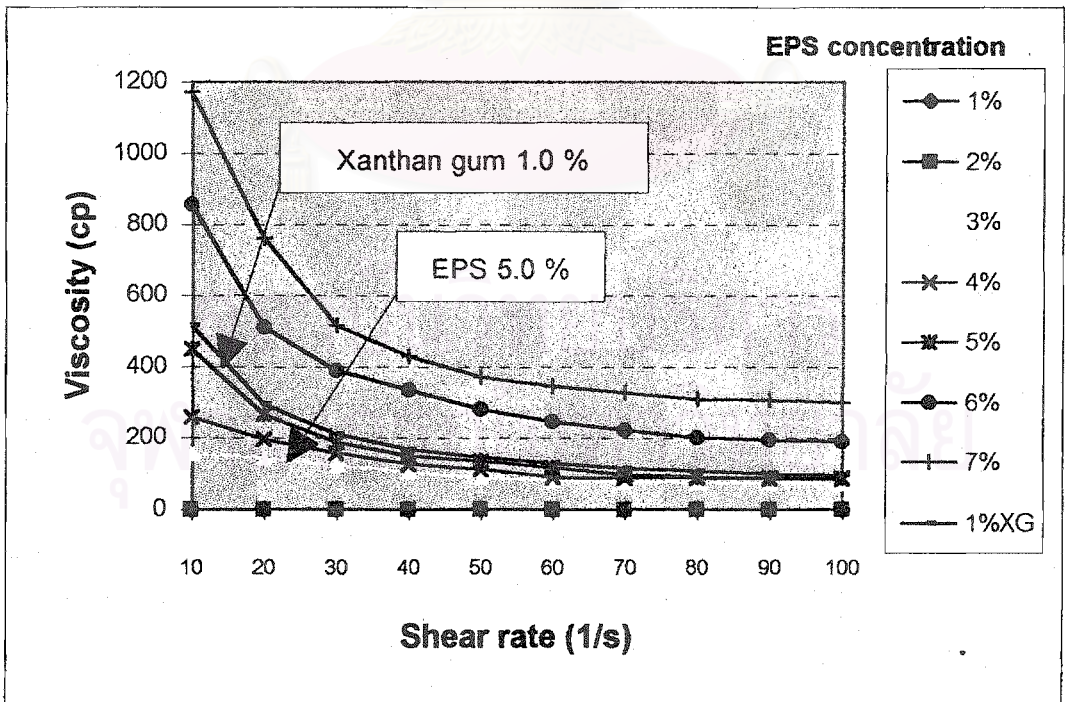
รูปที่ 15 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 - 7.0 เปอร์เซ็นต์



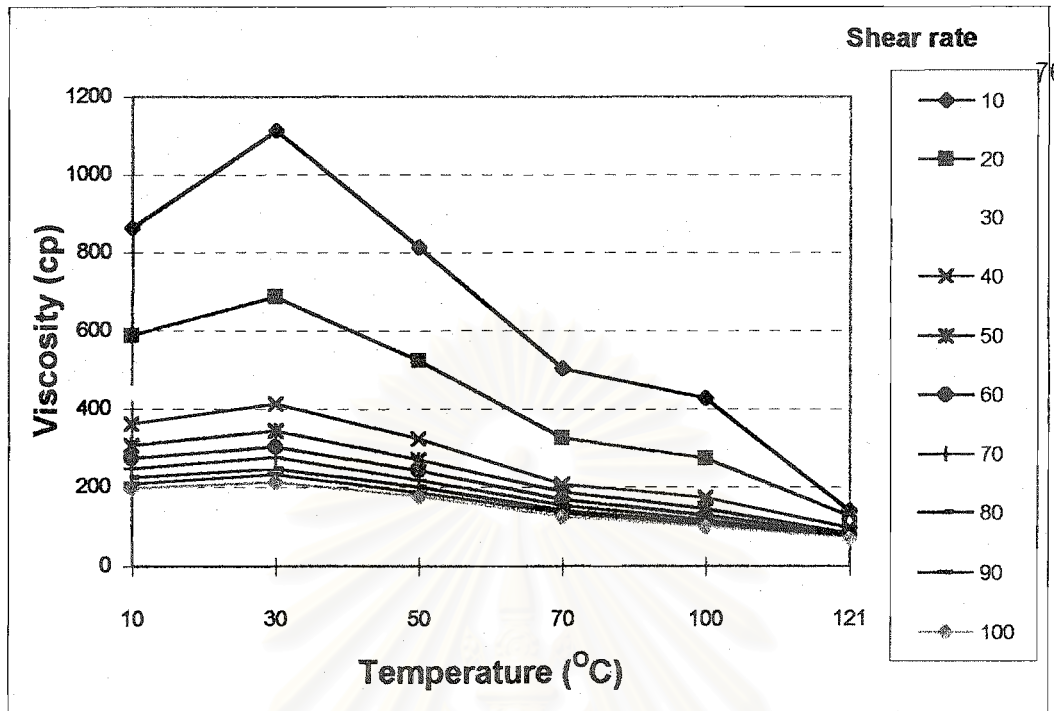
รูปที่ 16 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 - 7.0 เปอร์เซ็นต์



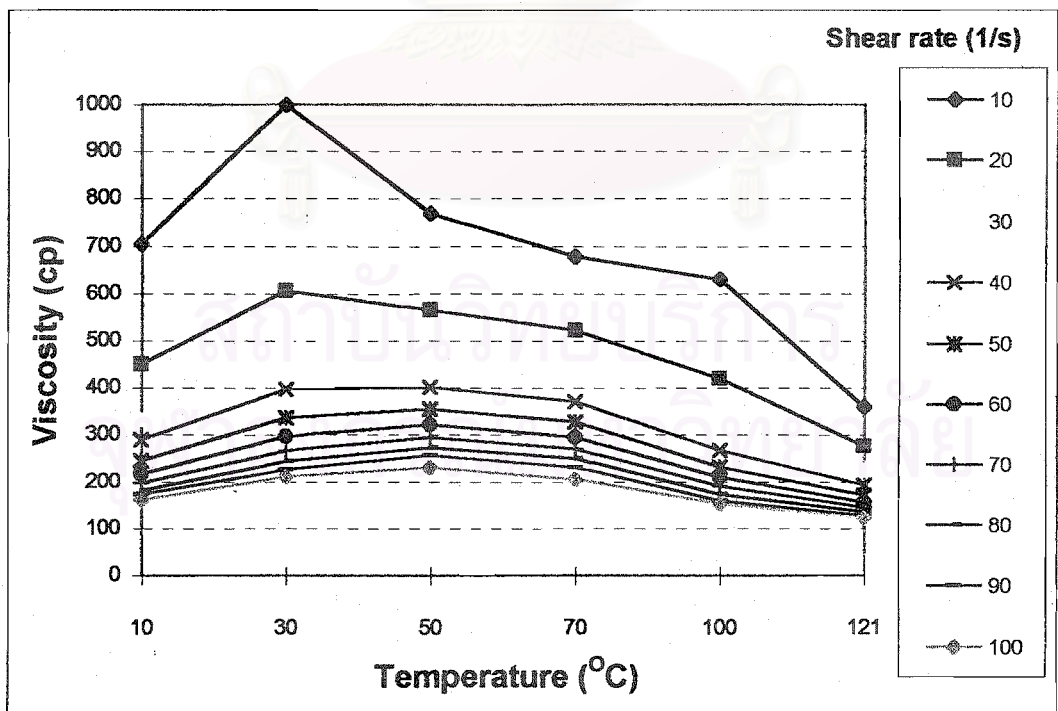
รูปที่ 17 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 - 7.0 เปอร์เซ็นต์



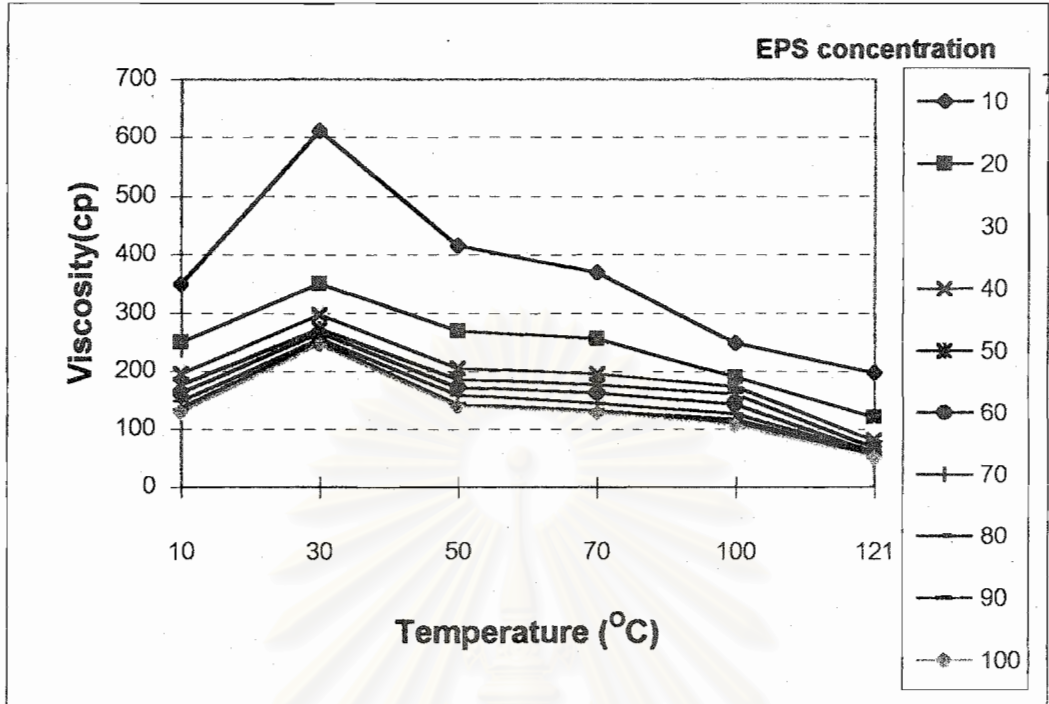
รูปที่ 18 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 - 7.0 เปอร์เซ็นต์



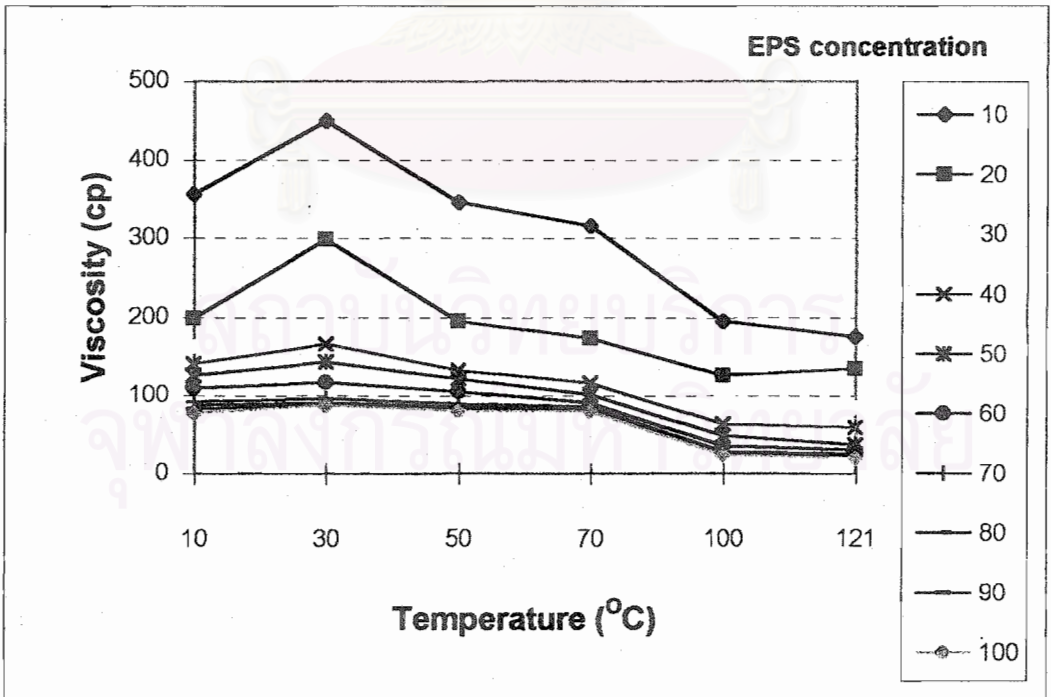
รูปที่ 19 แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน



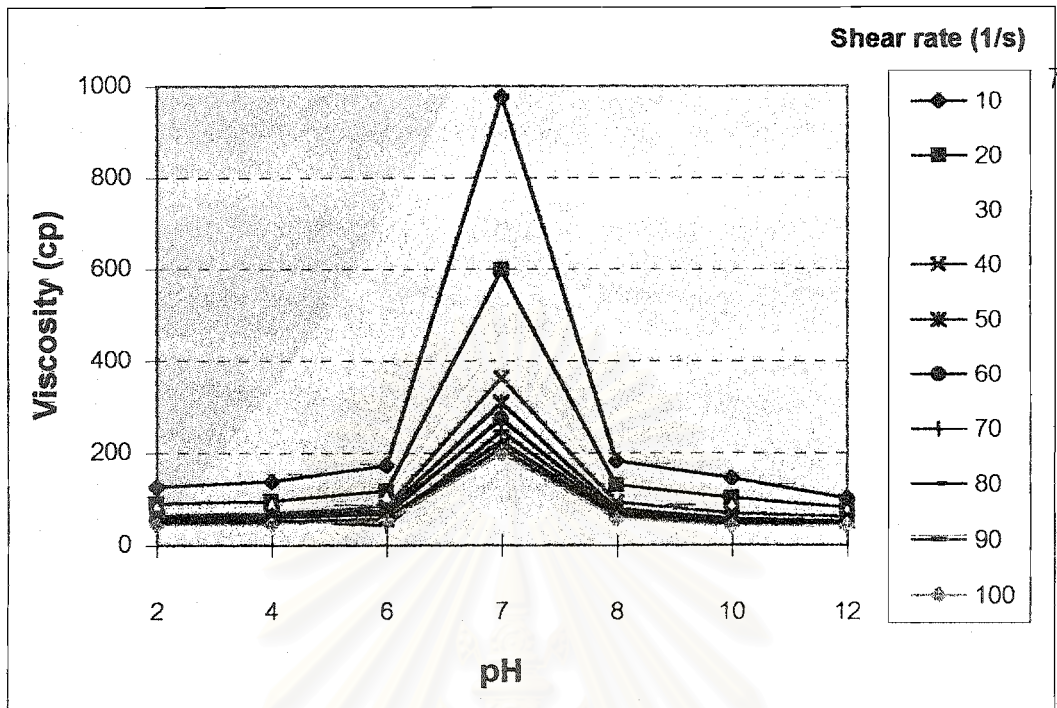
รูปที่ 20 แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน



รูปที่ 21 แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

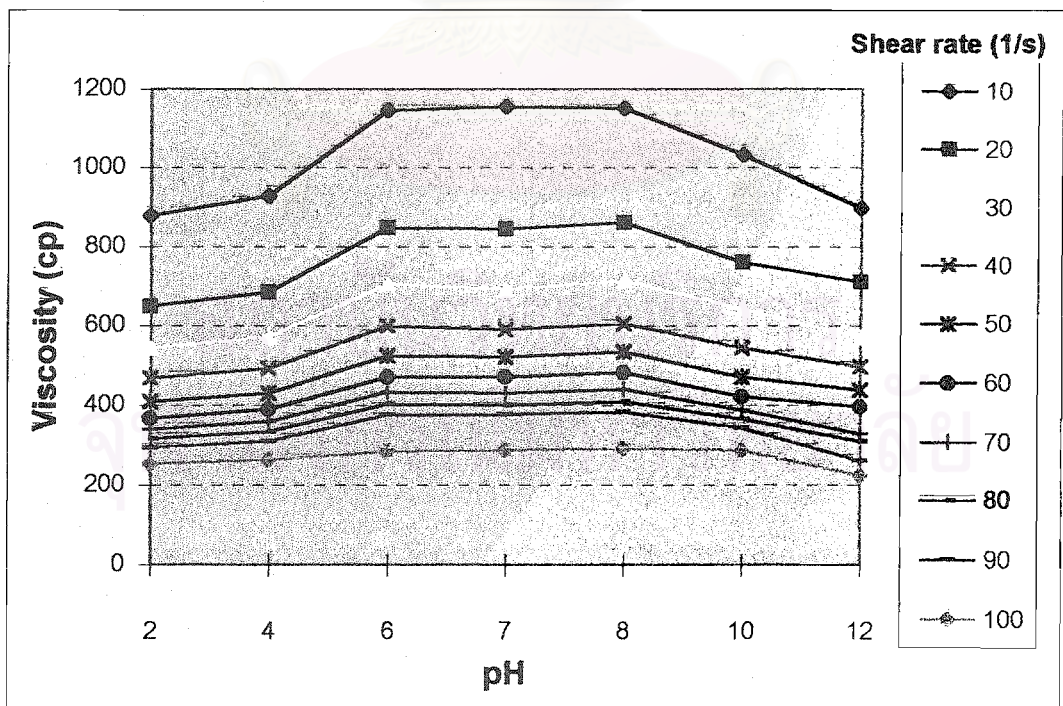


รูปที่ 22 แสดงค่าความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

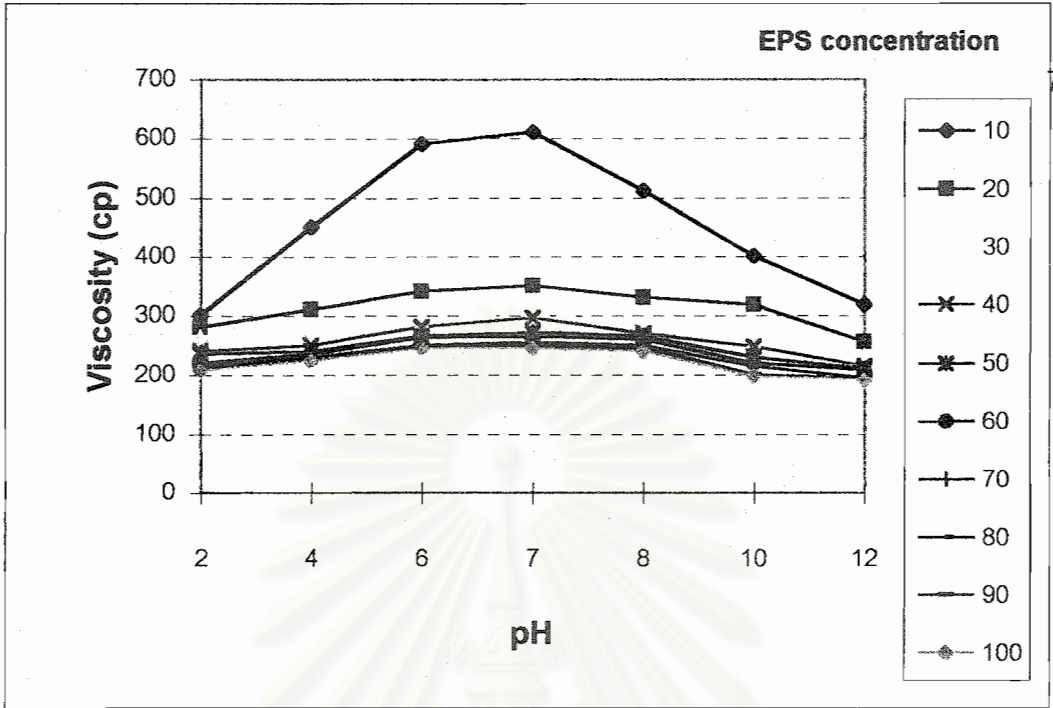


78

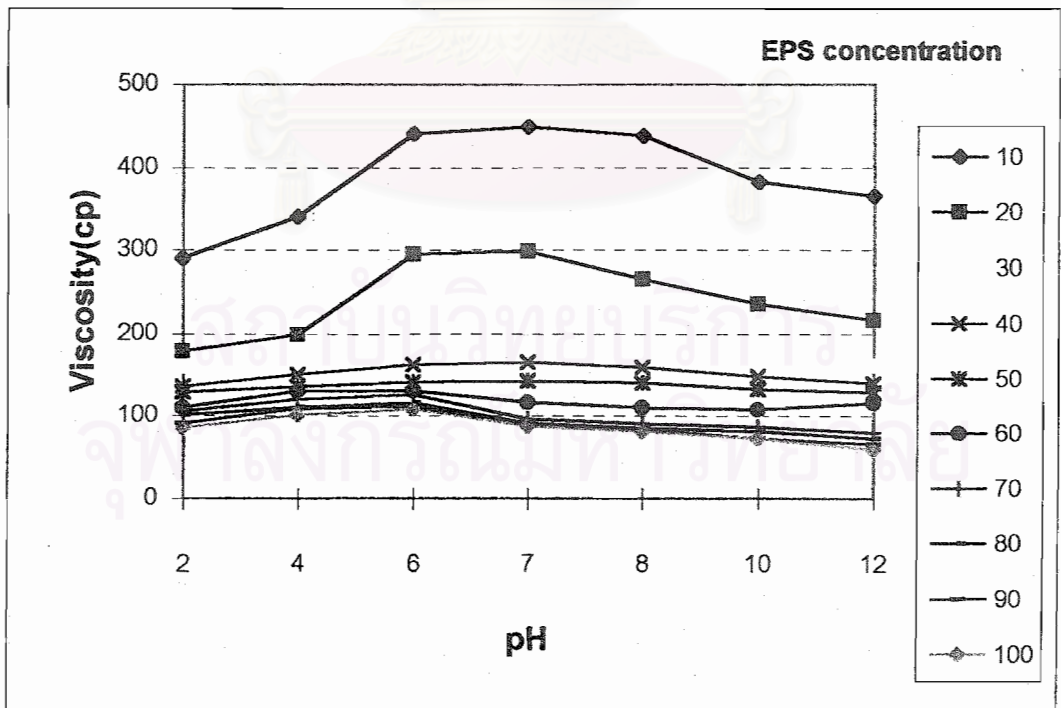
รูปที่ 23 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl



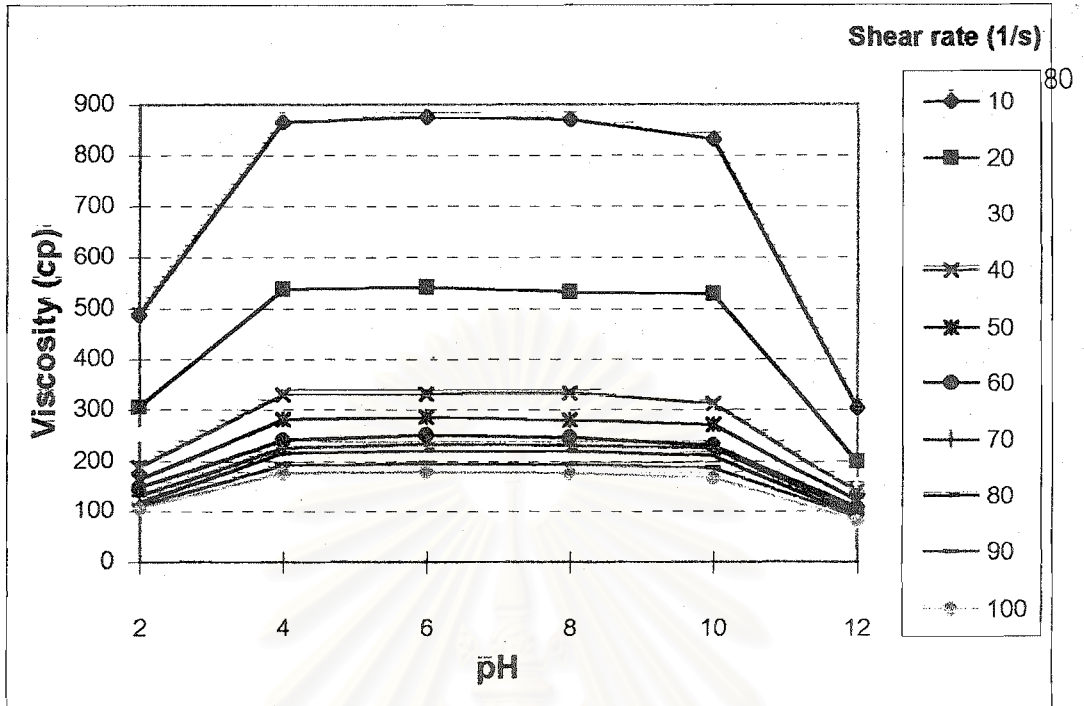
รูปที่ 24 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl



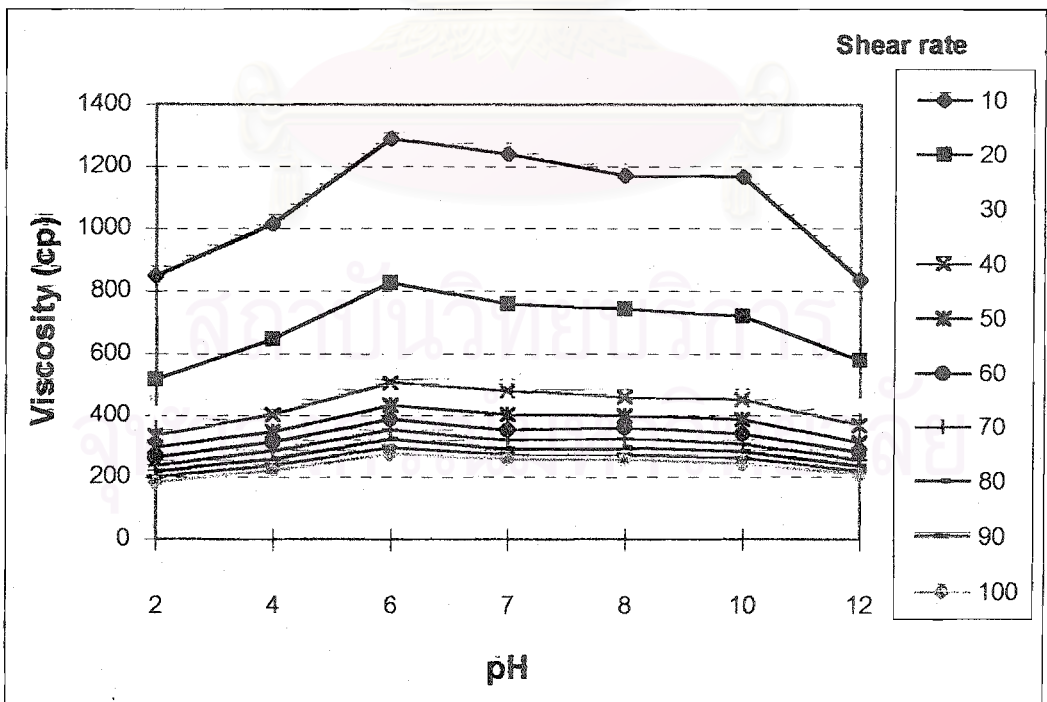
รูปที่ 25 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl



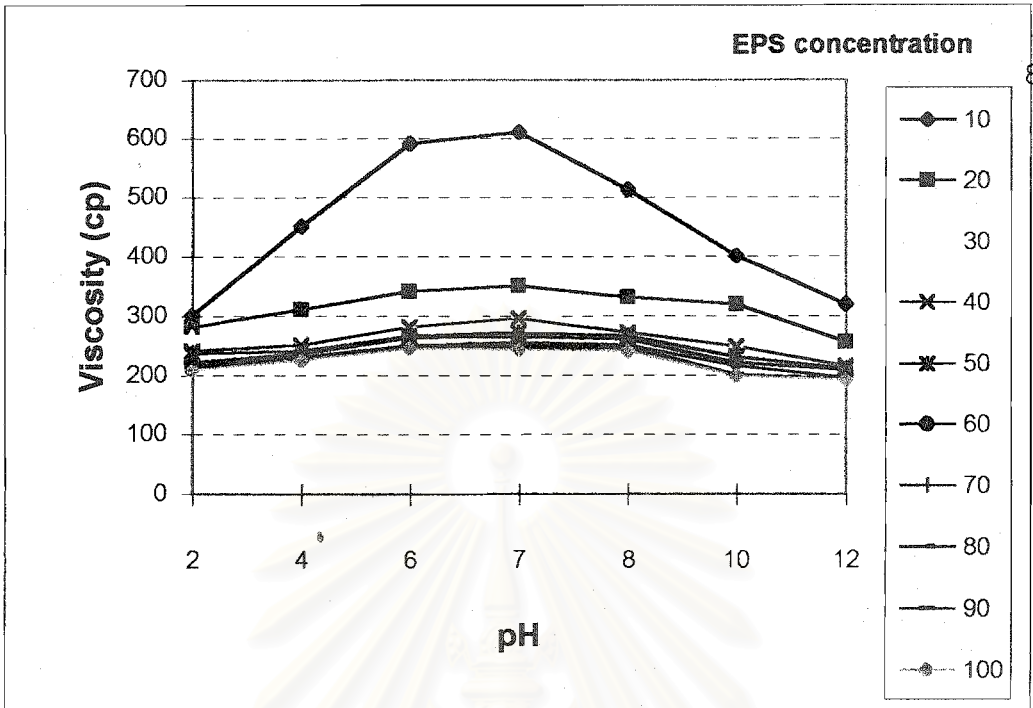
รูปที่ 26 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายที่ปรับ pH โดยใช้ NaOH และ HCl



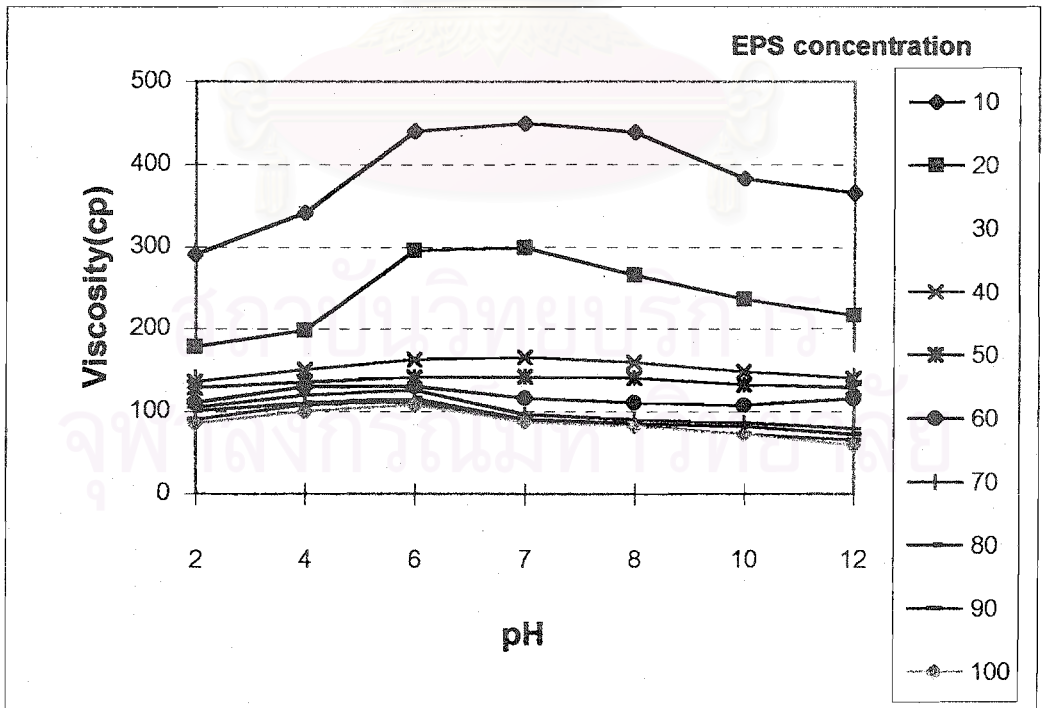
รูปที่ 27 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ



รูปที่ 28 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ



รูปที่ 29 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ



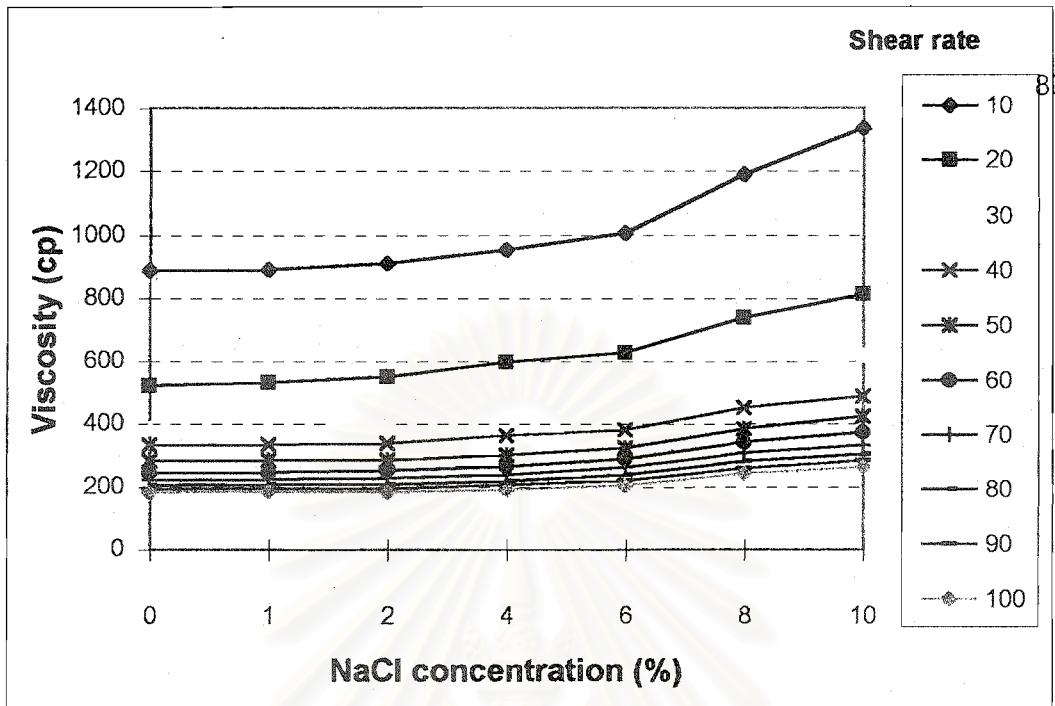
รูปที่ 30 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เมื่อใช้สารละลายที่ปรับ pH ด้วย NaOH และ HCl สารละลาย AP-1 มีความสามารถทนต่อ pH ได้ค่อนข้างต่ำกว่าความหนืดของสารละลาย EPS จาก AP-3, LE13-1 และ LE13-2 แต่ในสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลาย EPS จาก AP-1 มีความคงทนต่อ pH มากขึ้น ในขณะที่สารละลาย EPS จาก AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีลักษณะการทนต่อ pH เหมือนกันทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายที่ปรับด้วย NaOH และ HCl

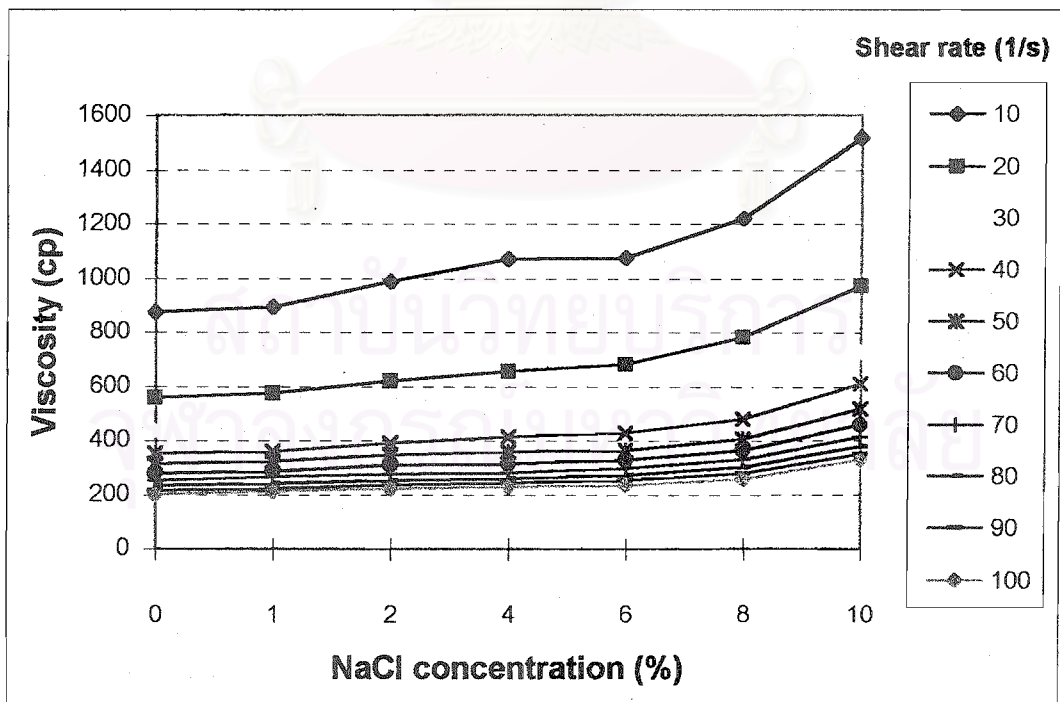
9.1.3 ผลของเกลือต่อความหนืด

เมื่อละลาย EPS ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่แปรความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารละลาย EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยค่าความหนืดจะเพิ่มขึ้นมาก เมื่อเปอร์เซ็นต์ของ NaCl มากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ แต่ในกรณีของ LE 13-1 และ LE 13-2 เมื่อใช้ NaCl 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าความหนืดจะลดลง เนื่องจาก EPS เริ่มจับตัวกันเป็นก้อนไม่ละลาย ผลของ NaCl ต่อความหนืดของสารละลาย EPS จากเชื้อทั้ง 4 ดังแสดงในรูปที่ 31 - 34

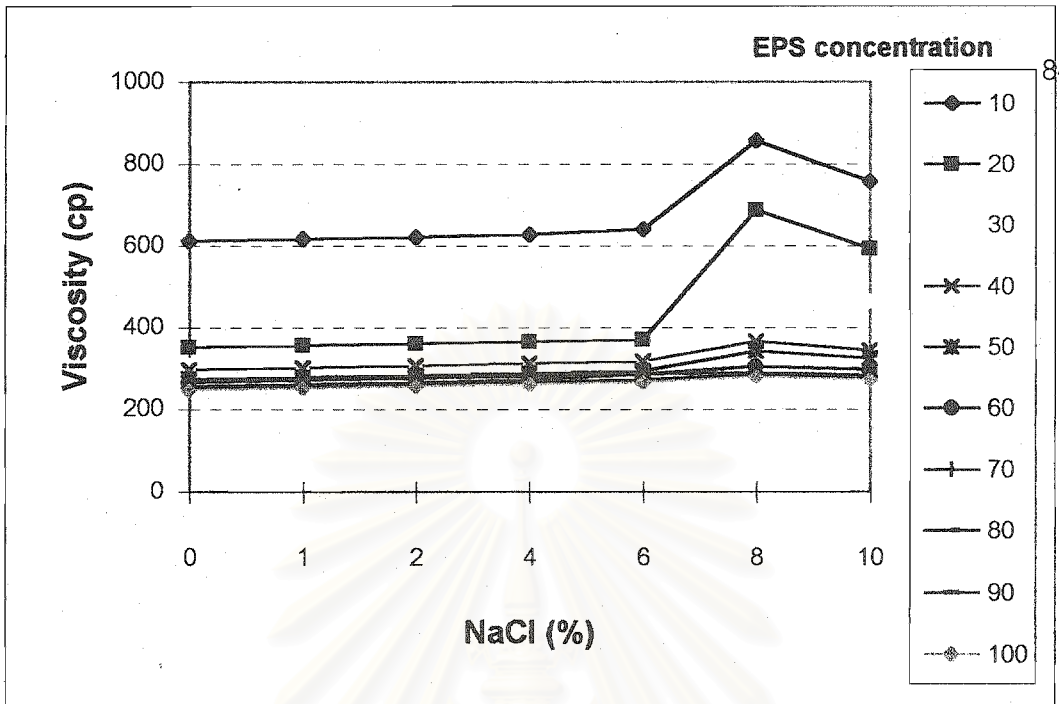
เมื่อละลาย EPS ในสารละลายเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่แปรความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารละลาย EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, LE13-1 และ LE13-2 มีความหนืดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อความเข้มข้นของ KCl สูงขึ้น โดยเมื่อความเข้มข้นของ KCl สูงถึง 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1 จะไม่ละลายในสารละลาย KCl ดังแสดงในรูปที่ 35 สำหรับสารละลาย EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-3 จะมีความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณ KCl เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ KCl สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-3 จะไม่ละลายในสารละลาย KCl ดังแสดงในรูปที่ 36 ผลของปริมาณ KCl ต่อความหนืดของสารละลาย EPS จาก LE 13-1 และ LE13-2 จะคล้ายกับผลของ NaCl คือ เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น มากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ความหนืดสูงขึ้นมา และที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าความหนืดจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 37 และ 38



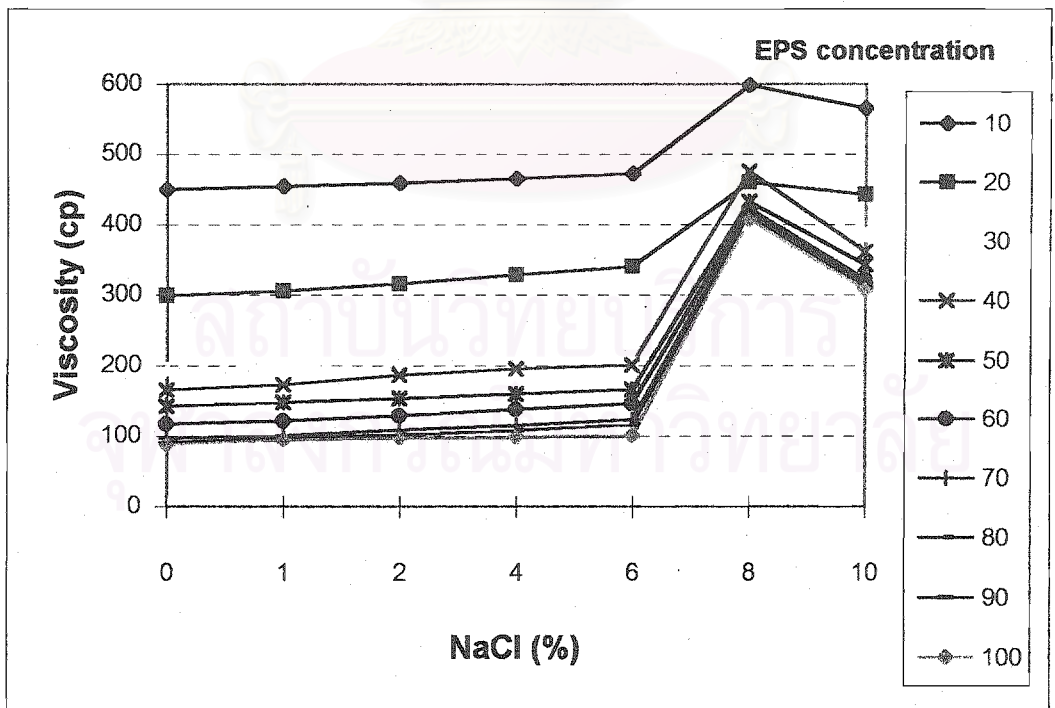
รูปที่ 31 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



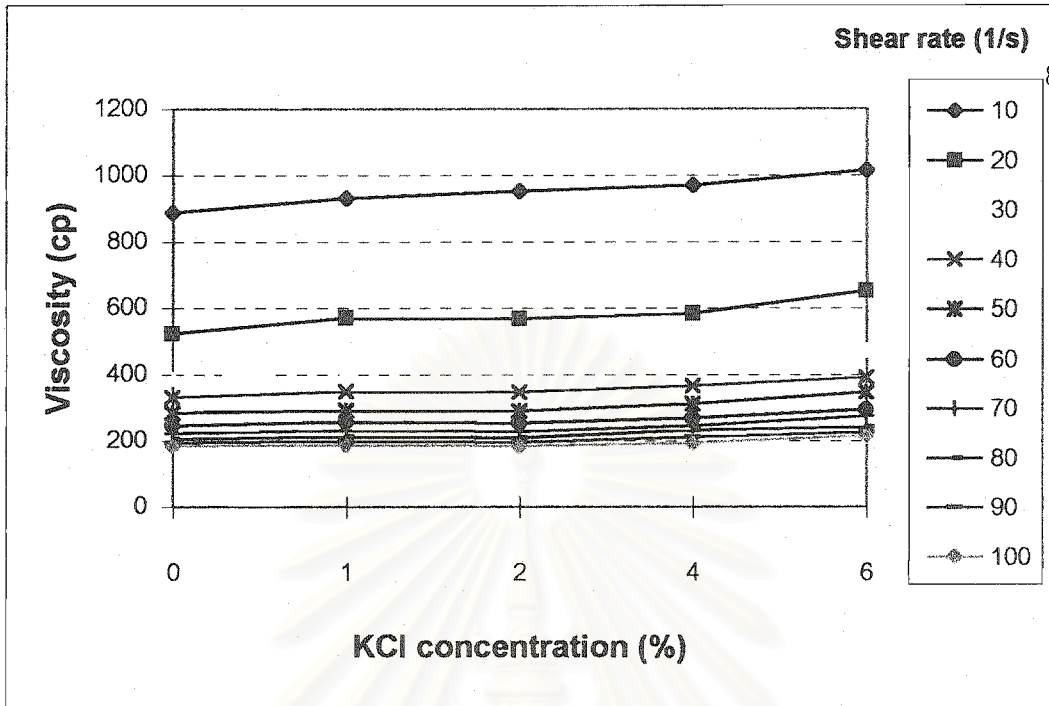
รูปที่ 32 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



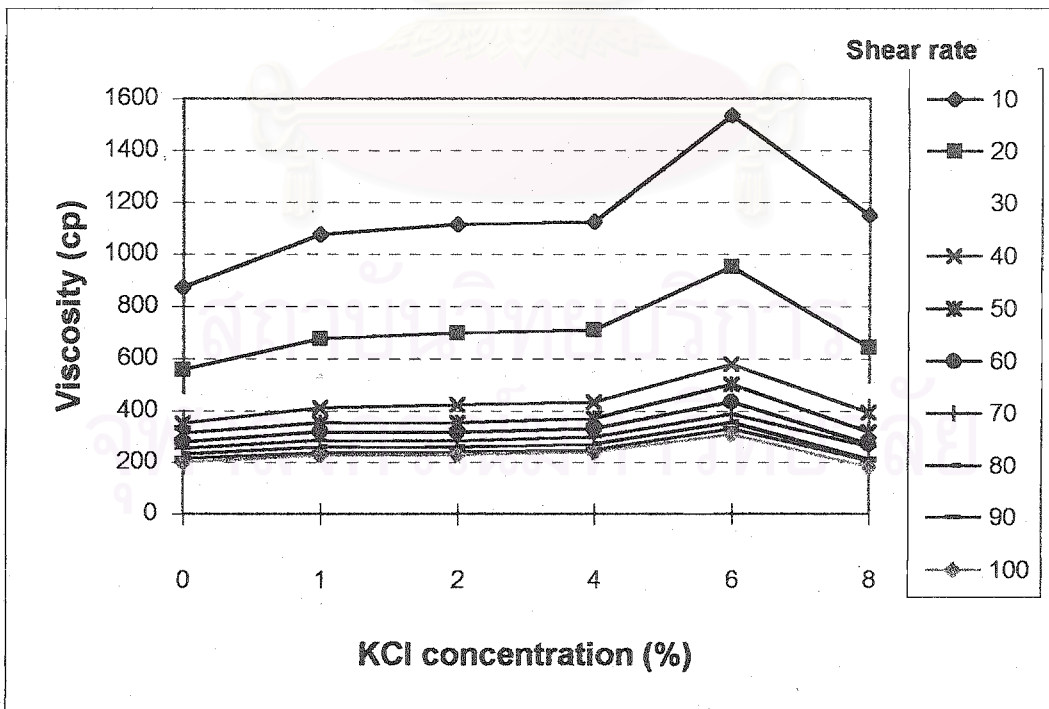
รูปที่ 33 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



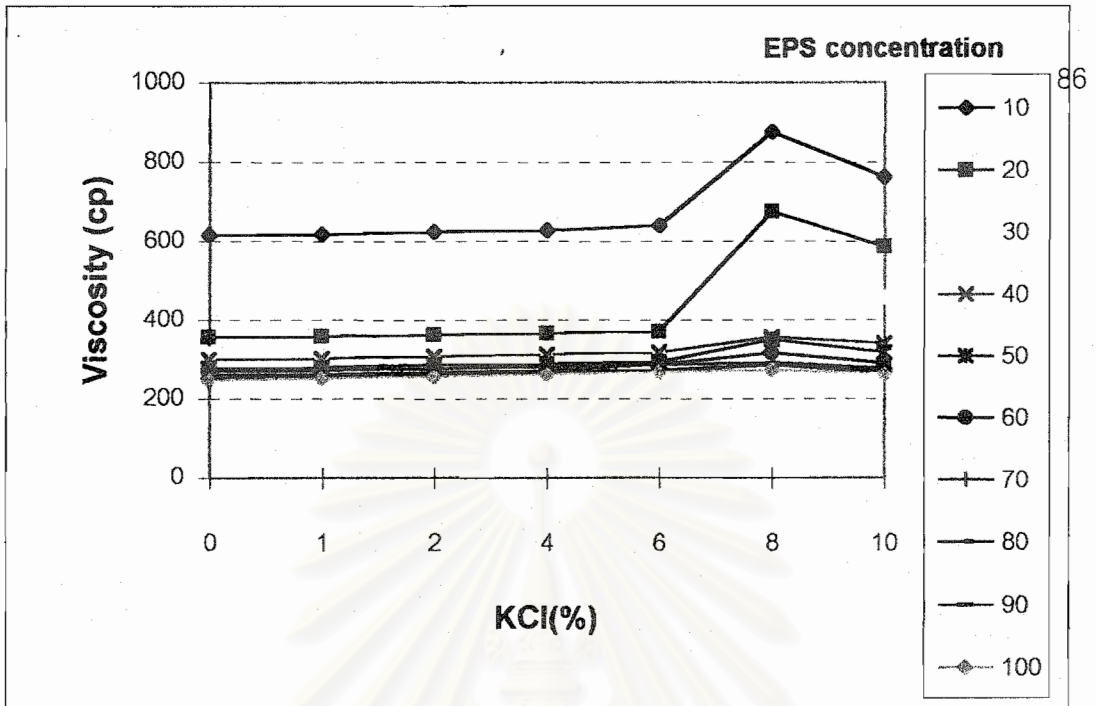
รูปที่ 34 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



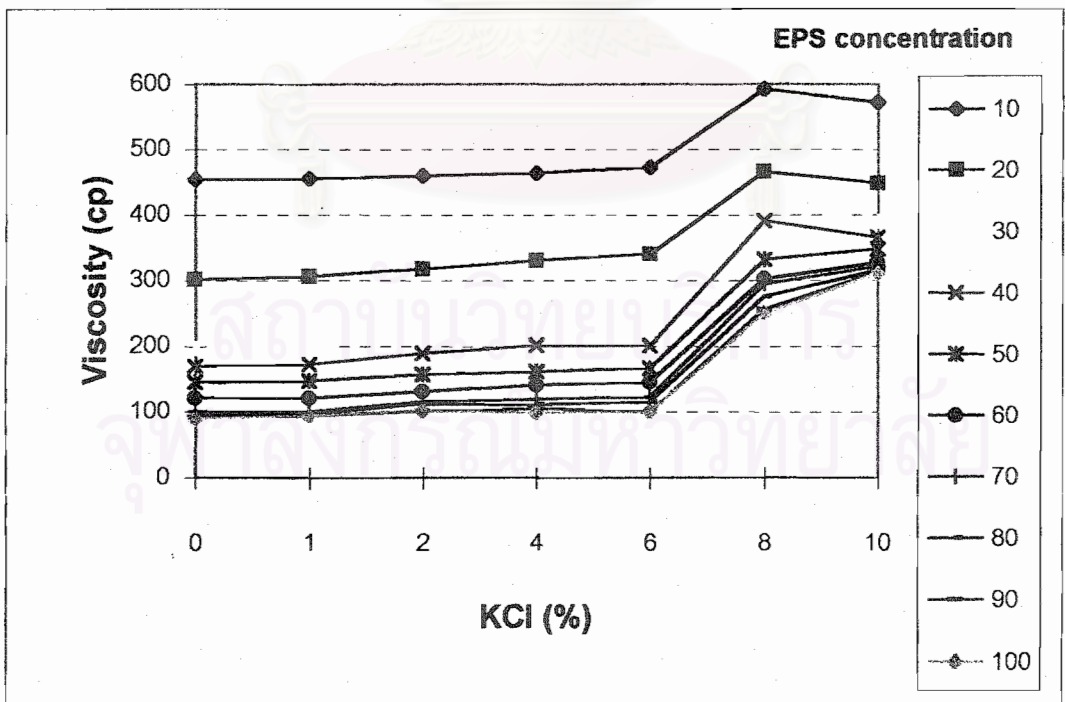
รูปที่ 35 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 36 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 37 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 38 แสดงลักษณะความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อละลายในสารละลายที่มีเกลือ KCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์

9.2 ผลการทดสอบความสามารถในการเป็น Emulsifier

พบว่า EPS ที่ผลิตจากทั้ง 4 เชื้อ เมื่อนำมาละลายกับน้ำแล้วนำไปละลายกับน้ำมันทำให้สารละลายเกิดความไม่สม่ำเสมอ มีการแยกชั้นระหว่างน้ำกับไขมันจึงไม่สามารถวัดค่าได้ ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงลักษณะของการทดสอบความสามารถในการเป็น Emulsifier ของ EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, AP-2, LE13-1 และ LE13-2

EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ	ลักษณะของสารละลายบัพเฟอ์กับน้ำมัน
AP-1	เกิดการแยกชั้น
AP-2	เกิดการแยกชั้น
LE13-1	เกิดการแยกชั้น
LE13-2	เกิดการแยกชั้น

9.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเป็น Stabilizer

จากการทดลองเมื่อนำ EPS แต่ละชนิดมาใส่ในน้ำนมรสโกโก้ซึ่งแปรความเข้มข้นของ EPS เป็น 5 ระดับ คือ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 โดยเปรียบเทียบกับการใช้คาราจีแนน ทำการแปรระยะเวลาในการเก็บรักษาเป็น 3 ระดับ คือ 7, 14 และ 21 วัน โดยเปรียบเทียบการตกตะกอนของโกโก้กับการทดลองควบคุม คือ นมที่ไม่ได้เติมสาร Stabilizer พบว่า EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ไม่สามารถควบคุมการตกตะกอนของโกโก้ได้ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น ในขณะที่ Carageenan ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมการตกตะกอนได้ใน 7-14 วัน ดังแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงผลของปริมาณตะกอนของโกล์ในน้ำนมพลาสเจอร์ไรซ์
เมื่อผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเทียบกับการ
การไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์ที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน

สารพอลิแซคคาไรด์	ปริมาณที่เติม (%)	เวลา (วัน)			
		0	7	14	21
AP-1	0.01	M	M	M	M
	0.02	M	M	M	M
	0.03	M	M	M	M
	0.04	M	M	M	M
	0.05	M	M	M	M
AP-3	0.01	M	M	M	M
	0.02	M	M	M	M
	0.03	M	M	M	M
	0.04	M	M	M	M
	0.05	M	M	M	M

หมายเหตุ L = ปริมาณโกล์ที่ตกตะกอน น้อยกว่า เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์

M = ปริมาณโกล์ที่ตกตะกอน เท่ากับ เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์

H = ปริมาณโกล์ที่ตกตะกอน มากกว่า เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 27 (ต่อ) แสดงผลของปริมาณตะกอนของโกโก้ในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์
เมื่อผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์ที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน

สารพอลิแซคคาไรด์	ปริมาณที่เติม (%)	เวลา (วัน)			
		0	7	14	21
LE13-1	0.01	M	M	M	M
	0.02	M	M	M	M
	0.03	M	M	M	M
	0.04	M	M	M	M
	0.05	M	M	M	M
LE13-2	0.01	M	M	M	M
	0.02	M	M	M	M
	0.03	M	M	M	M
	0.04	M	M	M	M
	0.05	M	M	M	M
Carageenan (Viscarin SD 389)	0.01	M	M	M	M
	0.02	M	M	M	M
	0.03	M	M	M	M
	0.04	L	L	M	M
	0.05	L	L	M	M

หมายเหตุ L = ปริมาณโกโก้ที่ตกตะกอน น้อยกว่า เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์

M = ปริมาณโกโก้ที่ตกตะกอน เท่ากับ เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์

H = ปริมาณโกโก้ที่ตกตะกอน มากกว่า เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารพอลิแซคคาไรด์

บทที่ 5

การอภิปรายผล

1. ผลของแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาและการแยกเชื้อจากอาหารหมักดองและน้ำอ้อย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมีแหล่งที่มา 2 แหล่งคือได้จากแยกขึ้นใหม่ 50 เชื้อ และเชื้อที่แยกโดย รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ จำนวน 75 เชื้อ (Tanasupawat and Daengsubha, 1983 ; Tanasupawat et, al., 1992: Tanasupawat et al.,1993) เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการผลิต EPS

2. ผลการจัดกลุ่มเชื้อขึ้นต้น

จากการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อที่แยกได้โดยพิจารณาจากรูปร่างเซลล์ การสร้างเอนไซม์แคตาเลส การสร้างแก๊สจากกลูโคส ซึ่งเชื้อที่แยกได้จัดเป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแลคติกโดยเชื้อจะมีคุณสมบัติร่วมกัน คือ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส โดยสามารถแยกสายพันธุ์ที่ต่างกันโดยอาศัยรูปร่างของเซลล์ถ้ามีรูปร่างเป็นแท่ง (Rod) จัดเป็นพวก *Lactobacillus* ส่วนเชื้อที่มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นแบบสี่เหลี่ยม (Tetrad) และไม่สร้างแก๊สจากกลูโคสจัดเป็นพวก *Pediococcus* ส่วนเชื้อที่มีรูปร่างกลมจัดเรียงตัวเป็นสาย และสร้างแก๊สจากกลูโคสจัดอยู่ในพวก *Leuconostoc* และเมื่อรวมกับเชื้อที่ได้รับจาก รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ จะได้เชื้อที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการผลิต EPS ทั้งหมด 125 เชื้อ โดยเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* 75 เชื้อ , *Pediococcus* 22 เชื้อ และ *Leuconostoc* 28 เชื้อ

3. ผลการคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิต EPS

เชื้อจุลินทรีย์แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบความสามารถในการผลิต EPS บนอาหารแข็งพบว่าสร้างได้ 25 เชื้อ แต่เมื่อนำไปทดสอบการสร้าง EPS ในอาหารเหลวพบว่าเชื้อที่สามารถผลิต EPS ได้มากกว่า 0.1 กรัมต่อลิตร มีเพียง 4 เชื้อคือ AP-1, AP-3, LE 13.1 และ LE 13.2 นอกจากนี้ เมื่อแปรชนิดของคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส พบว่าเชื้อสามารถผลิต EPS ได้ในน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็น Specific substrates ในการสังเคราะห์ EPS เช่นเดียวกับ Levan, Mutans และ Dextrans (Cerning, 1990) และเช่นเดียวกับ *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จากไวน์ (Manca de Nadra and Strasser de Sadd, 1995) ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละชนิดว่ามีความต้องการแหล่งคาร์บอนชนิดใด ในขณะที่ Roberts และคณะ (1995) พบว่าการผลิต EPS ของเชื้อ *Bifidobacterium longum* พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสจะให้ปริมาณ EPS สูงกว่าการใช้ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส หรือน้ำตาลกลูโคส ถึง 200-300 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่น้ำตาลแลคโตสเหมาะสมต่อการผลิต EPS น่าจะเป็นเพราะเชื้อ *Bifidobacterium longum* สามารถหมักแลคโตสและเป็นเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมหมัก (Fermented milk product) ส่วน *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 สามารถสร้าง EPS ได้ในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแต่มีการเจริญต่ำมากเมื่อเจริญในน้ำตาลฟรุคโตสหรือน้ำตาลแมนโนส (Grobben et al., 1995) ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักเช่นกัน

การผลิต EPS จากเชื้อสายพันธุ์ *Pediococci* ที่พบในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และไวน์ สามารถผลิต β -glucan โดยสามารถผลิตได้ 50 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออาหารประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และผลิตได้ 5 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำตาลชนิดอื่น (Cerning, 1990)

Manca de Nadra และ Strasser de Saad (1995) ได้คัดแยกเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่สามารถผลิต EPS ได้จากไวน์ที่ผลิตในอาร์เจนตินา เป็นต้น

4. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์

นำเชื้อที่สามารถสร้าง EPS ได้สูงมาพิสูจน์เอกลักษณ์ เมื่อเปรียบเทียบผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และชีวเคมี ดังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของ *Pediococcus* sp. ในตารางที่ 28 จากการพิจารณาในข้อที่ 1a พบว่าทั้ง AP-1 และ AP-3 เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลไรโบส (ribose) เป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถสร้างกรดได้ สร้างแอมโมเนียจากการย่อยสลายอาร์จินีนได้ (hydrolysis of arginine) จึงไปพิจารณาในข้อที่ IIb พบว่าทั้ง AP-1 และ AP-3 ไม่สามารถเจริญได้เมื่ออยู่ในภาวะที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเชื้อจึงไม่น่าจะอยู่ในพวก *Pediococcus halophilus* เมื่อไปพิจารณาในข้อที่ IIIa พบว่าทั้ง AP-1 และ AP-3 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตส (maltose) ดังนั้นทั้งเชื้อ AP-1 และ AP-3 จึงจัดอยู่ในสกุล *Pediococcus* และใกล้เคียงกับ *Pediococcus pentosaceus* (Balows et al., 1992)

ตารางที่ 28 แสดงการจัดจำแนกเชื้อสกุล *Pediococcus*

I a) ribose fermented, NH ₃ from arginine	II
I. b) ribose not fermented, no NH ₃ from arginine	IV
II a) growth in 15% NaCl, L(+)-lactate produced	<i>P.halophilus</i>
II b) no growth in 15% NaCl, DL-lactate produced	III
III a) growth at 50°C, maltose not fermented	<i>P.acidilactici</i>
III b) no growth at 50°C, maltose fermented	<i>P.pentosaceus</i>
IV. a) starch fermented, L(+)-lactate produced	<i>P.dextrinicus</i>
IV. b) starch not fermented, DL-lactate produced	V
V. a) growth at 35°C	VI
V. b) no growth at 35°C	<i>P.damnosus</i>
VI. a) lactose fermented	<i>P.inopinatus</i>
VI. b) lactose not fermented	<i>P.parvulus.</i>

ที่มา : (Balows et al., 1992)

5. ผลการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิต EPS

การเจริญและการผลิต EPS ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตได้ในช่วงใด จากการทดลองพบว่า ทั้ง AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีลักษณะการสร้าง EPS เกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กับการเจริญของเชื้อ และหยุดผลิตเมื่อเชื้อเข้าสู่ Stationary phase มีแนวโน้มว่า EPS เป็น Growth-associated แต่การผลิต EPS ยังไม่ทราบว่าจะดำเนินต่อไปในช่วง Stationary phase หรือไม่ หากได้ทำการควบคุม pH เพราะเชื้อแบคทีเรียจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและมีช่วง pH ที่ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นเมื่อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าใกล้ค่า pH ที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ เชื้อจะหยุดการเจริญเติบโตและทำให้ Activity ทุกอย่างหยุด จึงพิสูจน์ไม่ได้ว่าเชื้อจะหยุดการผลิตเมื่อเข้าสู่ Stationary phase สำหรับเชื้อ AP-1 และ AP-3 ซึ่งจากการทดลองพบว่า หยุดการเจริญเติบโตและการผลิต EPS เมื่อ pH มีค่าประมาณ 4.3 แต่จากการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อสามารถโตได้ที่ pH 4.0 ก็อาจจะสรุปได้ว่า การผลิต EPS เกิดขึ้นพร้อมการเจริญ เรียกว่า Growth-associated จึงอาจถือได้ว่า EPS เป็นสารเมตาบอไลต์ (Metabolite substance) แบบปฐมภูมิ (Primary metabolite) ซึ่งผลนี้ต่างจากการศึกษาซึ่งใช้เชื้อ *Pediococcus cerevisiae* ที่แยกได้จากไวน์ซึ่งพบว่า จะเริ่มผลิต EPS ในช่วงปลายของ Logarithmic phase (Lonvaud-Funel and Jojeux, 1988) โดย *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งแยกได้จากไวน์เช่นเดียวกันซึ่งเริ่มผลิต EPS หลังจากชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นช่วง Stationary phase และหยุดผลิตหลังจากชั่วโมงที่ 22 ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าลักษณะการผลิตขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ สำหรับเชื้อ *Leuconostoc* นั้น เชื้อในกลุ่มที่เป็น non-acidophilic species ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อ pH ภายในเซลล์มีค่าต่ำกว่า 5.4-5.7 (McDonald et al., 1990) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการผลิต EPS ของ LE13-1 และ LE 13-2 อาจเป็นแบบ non growth-associated ด้วย ลักษณะการผลิต EPS ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ แล้วอาจจะขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการผลิตด้วย (Sutherland, 1982) เช่น แหล่งคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน และแร่ธาตุต่าง ๆ สำหรับการศึกษานี้เชื้อ LAB อื่น ๆ พบว่า *Lactobacillus sake* 0-1 สร้าง EPS ในช่วง Early growth phase และหยุดเมื่อเข้าสู่ Stationary phase (van den Berg et al., 1995) นอกจากนี้ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 420 สามารถสร้าง EPS ได้ เมื่ออยู่ในช่วง Stationary growth phase (Manca de Nadra et al., 1985 ; Kojic et al., 1992)

ตารางที่ 29 แสดงความแตกต่างของเชื้อในกลุ่ม *Leuconostoc* sp.

Table 5. Differentiation within the genus *Leuconostoc*.

<i>Leuconostoc</i> species	Growth at 1°C	Growth at 37°C	Growth at pH 4.8	Growth in 10% ethanol	Esculin hydrolysis	Acid formed from:														Dextran from sucrose	Lemon-yellow pigment	Mol% GC	Peptidoglycan type
						L-Arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Salicin	Sucrose	Trehalose				
<i>Lc. amelibiosum</i>	+	ND	-	ND	+	+	+	+	ND	-	+	-	ND	-	-	+	+	+	-	+	-	42	Lys-Ala ₂
<i>Lc. carnosum</i>	+	±	ND	ND	d	-	±	+	-	+	-	ND	d	-	d	d	+	+	-	±	-	39	ND
<i>Lc. citreum</i>	ND	d	ND	ND	±	±	±	±	±	-	+	d	+	±	-	±	+	+	±	ND	±	38-40	ND
<i>Lc. gelidum</i>	+	±	ND	ND	+	+	+	-	-	d	-	+	+	+	d	+	+	+	+	±	-	37	ND
<i>Lc. lactis</i>	ND	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	d	d	d	±	d	+	-	-	-	43-45	Lys-Ala ₂
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	38-40	Lys-Ser-Ala ₂
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	ND	+	-	-	d	-	±	±	d	d	±	±	d	d	d	ND	±	±	+	d	+	37-40	Lys-Ser-Ala ₂
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	ND	d	-	-	±	+	d	+	±	d	±	d	±	±	d	±	±	+	+	d	+	37-39	Lys-Ser-Ala ₂
<i>Lc. oenos</i>	ND	d	+	+	+	±	±	+	d	-	-	-	d	d	-	d	d	-	+	d	-	37-39	Lys-Ser ₂ Lys-Ala-Ser
<i>Lc. paramesenteroides</i>	ND	d	±	-	d	±	d	+	+	d	+	±	+	+	d	+	-	±	+	±	-	37-38	Lys-Ala ₂
<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	ND	+	ND	ND	d	±	±	+	±	d	+	±	+	±	±	+	d	±	+	+	±	38-41	Lys-Ser-Ala ₂ *

+, positive reaction; -, negative reaction; ±, most strains positive; ∓, most strains negative; d, variable reaction; ND, no data.

*Deduced from information on the cell wall of strain DSM 20193 (Schillinger et al., 1989).

Data from Farrow et al. (1989), Garvie (1984), Schillinger et al. (1989), and Shaw and Harding (1989).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิต EPS

การเจริญและการผลิต EPS ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ว่ามีความสามารถในการผลิตได้ในช่วงใด จากการทดลองพบว่า ทั้ง AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีลักษณะการสร้าง EPS เกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กับการเจริญของเชื้อ และหยุดผลิตเมื่อเชื้อเข้าสู่ Stationary phase มีแนวโน้มว่า EPS เป็น Growth-associated แต่การผลิต EPS ยังไม่ทราบว่าจะดำเนินต่อไปในช่วง Stationary phase หรือไม่ หากได้ทำการควบคุม pH เพราะเชื้อแบคทีเรียจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและมีช่วง pH ที่ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นเมื่อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าใกล้ค่า pH ที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ เชื้อจะหยุดการเจริญเติบโตและทำให้ Activity ทุกอย่างหยุด จึงพิสูจน์ไม่ได้ว่าเชื้อจะหยุดการผลิตเมื่อเข้าสู่ Stationary phase สำหรับเชื้อ AP-1 และ AP-3 ซึ่งจากการทดลองพบว่า หยุดการเจริญเติบโตและการผลิต EPS เมื่อ pH มีค่าประมาณ 4.3 แต่จากการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อสามารถโตได้ที่ pH 4.0 ก็อาจจะสรุปได้ว่า การผลิต EPS เกิดขึ้นพร้อมการเจริญ เรียกว่า Growth-associated จึงอาจถือได้ว่า EPS เป็นสารเมตาบอไลต์ (Metabolite substance) แบบปฐมภูมิ (Primary metabolite) ซึ่งผลนี้ต่างจากการศึกษาซึ่งใช้เชื้อ *Pediococcus cerevisiae* ที่แยกได้จากไวน์ซึ่งพบว่าจะเริ่มผลิต EPS ในช่วงปลายของ Logarithmic phase (Lonvaud-Funel and Jojeux, 1988) โดย *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งแยกได้จากไวน์เช่นเดียวกันซึ่งเริ่มผลิต EPS หลังจากชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นช่วง Stationary phase และหยุดผลิตหลังจากชั่วโมงที่ 22 ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ลักษณะการผลิตขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ สำหรับเชื้อ *Leuconostoc* นั้น เชื้อในกลุ่มที่เป็น non-acidophilic species ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อ pH ภายในเซลล์มีค่าต่ำกว่า 5.4-5.7 (McDonald *et al.*, 1990) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า การผลิต EPS ของ LE13-1 และ LE 13-2 อาจเป็นแบบ non growth-associated ด้วย ลักษณะการผลิต EPS ของเชื้อแบคทีเรียแลคโตคินั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์แล้วอาจจะขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการผลิตด้วย (Sutherland, 1982) เช่น แหล่งคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน และแร่ธาตุต่าง ๆ สำหรับการศึกษานี้ในเชื้อ LAB อื่น ๆ พบว่า *Lactobacillus sake* 0-1 สร้าง EPS ในช่วง Early growth phase และหยุดเมื่อเข้าสู่ Stationary phase (van den Berg *et al.*, 1995) นอกจากนี้ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 420 สามารถสร้าง EPS ได้เมื่ออยู่ในช่วง Stationary growth phase (Manca de Nadra *et al.*, 1985 ; Kojic *et al.*, 1992)

6. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS

เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต EPS ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน และ ปริมาณแร่ธาตุ รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS จึงได้แปรปริมาณสารอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน อุณหภูมิ และการให้อากาศ

6.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร

6.1.1 ผลการแปรปริมาณน้ำตาล

พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสจากปริมาณเดิมที่ใช้ในสูตรอาหาร เลี้ยงเชื้อ MRS คือ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณ EPS สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับที่ Cerning (1990) ได้กล่าวว่าการผลิต EPS จะสูงเมื่อปริมาณน้ำตาลมีมากเกินไป ซึ่งทั้งนี้ น่าจะเป็นเพราะน้ำตาลซูโครสเป็น Substrate สำหรับการผลิต EPS แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง จะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ค่อนข้างต่ำลง เนื่องจากเชื้ออาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งอาจเป็น เพราะมีปริมาณของแข็ง (Total solid) มากเกินไป สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกความเข้มข้น ของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมนั้น บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็น EPS ของเชื้อ ดังนั้นจึงน่าที่จะพิจารณาจากระดับของปริมาณซูโครสที่ให้ปริมาณ EPS ต่อปริมาณ น้ำตาลซูโครสตั้งต้นสูง

6.1.2 ผลการแปรปริมาณไนโตรเจน

พบว่าเชื้อ *Pediococcus* AP-1 และ AP-3 มีความต้องการสาร Yeast extract, Peptone และ Beef extract ในปริมาณค่อนข้างสูง สำหรับการที่จะผลิตให้ได้ EPS ปริมาณสูง ในขณะที่เชื้อ *Leuconostoc* LE13-1 และ LE13-2 มีความต้องการสารเหล่านี้ใน ปริมาณที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามพบว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS ของทั้ง 4 สายพันธุ์ ก็ยังคงจำเป็นต้องมีสารทั้ง 3 ชนิด การที่เชื้อเหล่านี้ต้องการสารไนโตรเจนเหล่านี้ในปริมาณที่สูง เพื่อให้ผลิต EPS ได้มาก น่าจะเป็นเพราะเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มี ลักษณะการผลิต EPS แบบเป็น Growth-associated โดยมีการผลิต EPS ไปพร้อมกับการเจริญ ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้มาก ซึ่ง ทำให้ได้ปริมาณ EPS สูง ดังนั้นจึงทำให้จำเป็นต้องใช้สารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารสูง อาทิ ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ พบว่า สารไนโตรเจนมีผลในการเพิ่มปริมาณ EPS เช่นกัน อาทิ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ Hydrolysed casien จะมีผลทำให้การผลิต EPS เพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มต้น (Garcia-Garibay and Marshall, 1991)

ในเชื้อ *Bifidobacterium longum* พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น Peptone และ Yeast extract จะให้ปริมาณ EPS สูงกว่าการใช้ Skim milk (Abbed et al., 1995) แสดงว่าสารอาหารจาก Beef extract , Yeast extract และ Peptone น่าที่จะมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิต EPS ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก

6.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

6.2.1 ผลการศึกษาผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่า

เนื่องจาก AP-1 และ AP-3 เป็นสายพันธุ์ของ *Pediococcus pentosaceus* และ LE13-1 และ LE13-2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในสกุล *Leuconostoc mesenteroides* ที่มีคุณสมบัติเป็น Facultative anaerobe ทำให้การเขย่ารวมทั้งระดับของอาหารเพื่อให้อากาศแก่จุลินทรีย์ไม่มีผลต่อการสร้าง EPS ของทั้งสองเชื้อ จึงทำให้ไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานและลดต้นทุนการผลิตได้ ทำให้เป็นข้อได้เปรียบกว่าการผลิต Xanthan gum ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Xanthomonas campestris* ที่จำเป็นต้องใช้อากาศในการเจริญ และเมื่อผลิต EPS ไปได้ระดับหนึ่ง อาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดความหนืดมากทำให้ต้องใช้พลังงานมากในการกวนทำให้สิ้นเปลืองพลังงานซึ่งเป็นต้นทุนของการผลิต (Mcneil, 1993)

6.2.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิ

เนื่องจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันไป สำหรับ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถผลิต EPS ได้สูงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งน่าจะเป็นเพราะการผลิต EPS ของทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีลักษณะเป็น growth associated และอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์นี้เช่นกัน ดังนั้นจึงทำให้ได้ปริมาณ EPS สูง ในเชื้อ *Lactobacillus casei* CG11 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จาก Cheese พบว่าสามารถผลิต EPS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ถึง 50 เท่า โดยพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิมิผลทำให้การผลิต EPS สูง และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 จะผลิต EPS ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส (Garcia-Garibay and Marshall., 1991) ในทางตรงกันข้ามพบว่า *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus cremoris* และ *Streptococcus thermophilus* ที่อุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้การผลิต EPS ต่ำ (Shallhaass., 1983)

7. ผลการทำให้ EPS บริสุทธิ์บางส่วน (EPS Partial purification)

การทำให้ EPS บริสุทธิ์บางส่วนต้องมีการนำอาหารที่บ่มครบ 2 วัน นำไปแยกเซลล์ออกโดยใช้วิธีการ Centrifuge แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสไปตกตะกอนโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเพื่อให้บริสุทธิ์มากขึ้น จึงทำการตกตะกอน 2 ครั้ง แล้วจึงละลาย EPS ในน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำสารละลาย EPS ไป ผ่านกระบวนการ Dialysis ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้สารโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาล และแร่ธาตุต่างๆ ออกไป แล้วจึงนำไปทำแห้งโดยใช้ Freeze dry จะได้ EPS เป็นผงสีขาว ซึ่งการทำแห้งโดยวิธีการใช้ Freeze dry จะทำให้ช่วยรักษาสภาพของ EPS ได้ดี สำหรับการใช้อุณหภูมิสูงนั้นไม่เหมาะสม เพราะความร้อนอาจมีผลทำให้โครงสร้างของ EPS เปลี่ยนแปลงไม่เหมาะสมที่จะนำมาทดสอบคุณสมบัติและทำให้ EPS มีสีน้ำตาล (Pace and Righelato, 1980)

8. การวิเคราะห์ผลการศึกษาคณสมบัติของ EPS

8.1 ชนิดประจุของโพลีแซคคาไรด์

พบว่า EPS ที่ผลิตได้จากทั้ง AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีลักษณะประจุเป็นแบบ Neutral polysaccharides เนื่องจากเมื่อมีการเติม Cetylpyridinium chloride แล้วไม่เกิดการตกตะกอน เช่นเดียวกับ Levan, Scleroglucan, Pullulan, Dextran และ Curdlan (Margaritis and Pace, 1985) โดยมีการเปรียบเทียบกับ xanthan gum ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบ Acidic polysaccharides ที่เกิดการตกตะกอน

8.2 การทดสอบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของ EPS

การใช้สภาวะที่กรดในการย่อยสลายพอลิเมอร์ แล้วนำไปฉีดด้วยเครื่อง HPLC พบว่า EPS ที่ได้จากทั้ง AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ น้ำตาลกลูโคส ทำให้สามารถจัดอยู่ในพวก Homopolysaccharides ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cerning (1990) ว่า EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อพวกแลคติกแอซิดแบคทีเรียมักมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ คือ น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลกาแลคโตส เป็นต้น

8.3 ผลการทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุล

พบว่าน้ำหนักโมเลกุลและขนาดของ Degree of polymerization ของ AP-1 ต่ำกว่าของ AP-3 ซึ่งทำให้สอดคล้องกับผลของคุณสมบัติด้านความหนืด เนื่องจาก EPS ที่ผลิตได้จาก AP-1 มีความคงตัว (Stability) ต่ำกว่า AP-3 เนื่องจากค่าความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล และ Degree of polymerization โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดสูงกว่าพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่วนพวกที่มีค่า Degree of polymerization สูงกว่าก็จะมีค่าความหนืดสูงกว่าพวกที่มีค่านี้ต่ำ (วาทีนี ปรินชาจารย์, personal communication) ส่วนเชื้อ LE13-1 และ LE13-2 ไม่มีผลการทดลอง เนื่องจากเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์เกิดความขัดข้อง

8.4 ผลการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เป็นพวกที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งกลูโคสเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรต การทดสอบนี้จึงเท่ากับเป็นการทำการทดลองเพื่อหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดพบว่า EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดสูงถึง 90.25, 85.20, 96.64 และ 99.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Lactobacillus brevis* ซึ่งได้มีรายงานว่าเป็น EPS ที่ผลิตได้ประกอบด้วยปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดสูงถึง 98 - 99 เปอร์เซ็นต์ (Pidoux et al., 1988)

8.5 ผลการทดสอบหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำมากโดย AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีปริมาณไนโตรเจน คือ 0.1, 0.4, 0.285 และ 0.178 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าวิธีการแยกนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้การผลิตได้ EPS ที่มีความบริสุทธิ์มากซึ่ง Pidoux และคณะ (1988) ได้รายงานว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Lactobacillus brevis* ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด เพียง 0.045 - 0.065 เปอร์เซ็นต์

9. การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Polysaccharide เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

9.1 การศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืดของ EPS ในน้ำกลั่นความเข้มข้นต่าง ๆ

พอลิแซคคาไรด์ที่เป็นที่ต้องการด้านอาหารควรมีคุณสมบัติที่ดีคือ ให้ความหนืดสูงและเมื่อ Shear rate เพิ่มขึ้น ความหนืดจะลดลง และเมื่อลด Shear rate ลงค่าความหนืดจะสูงเหมือนเดิมโดยมีคุณสมบัติเป็นแบบ Pseudoplastic ซึ่งเราเรียกคุณสมบัตินี้ว่า Shear thinning พบว่าสารละลาย EPS จาก AP-1, AP-3, LE 13-1 และ LE13-2 มีคุณสมบัติดังกล่าวเช่นเดียวกับ Xanthan gum และพอลิแซคคาไรด์อื่น ๆ (Urlacher and Dalbe, 1992) แต่ในด้านความสามารถในการให้ความหนืดนั้นยังต่ำกว่า Xanthan gum โดยจะต้องใช้ EPS ที่ผลิตโดยทั้ง 4 เชื้อในปริมาณที่สูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จึงจะได้ความหนืดของสารละลายเทียบกับการใช้ Xanthan gum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

9.1.1 ผลของอุณหภูมิ

สารละลายพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีแนวโน้มที่ความหนืดลดลงเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป โดยสารละลายพอลิแซคคาไรด์ของทั้ง 4 สายพันธุ์จะมีความหนืดที่คงตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่านั้น Linton และคณะ(1991) ได้รายงานว่าคุณสมบัติหลอมเหลว (Melting temperature : T_m) ของพอลิแซคคาไรด์ หมายถึง อุณหภูมิที่ทำให้พอลิแซคคาไรด์เปลี่ยนจากที่เคยอยู่ในรูป Ordered conformation ไปอยู่ในรูป Disordered conformation ซึ่งจะมีผลต่อค่าความหนืดของสารละลายทำให้ค่าความหนืดของสารละลายลดลงเนื่องจากค่าความหนืดขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ในกรณีของ Succinoglycan สารละลายจะมีความหนืดลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า T_m โดยความหนืดจะลดลงมาเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Linton *et al.*, 1991) ซึ่งการที่ความหนืดของสารละลาย EPS จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้เปลี่ยนแปลงไปเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป แสดงว่า อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส มีผลต่อการจัดเรียงตัวของสาร EPS ในสารละลาย

9.1.2 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติด้านความหนืด

สารพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีความสามารถในการคงทนต่อ pH ต่าง ๆ ไม่เหมือนกัน จากการวิจัยนี้พบว่า สาร EPS จากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ไม่มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH โดยจะให้ค่าความหนืดสูงสุด เมื่อค่า pH เป็นกลางเท่านั้น การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ในการปรับ pH มีผลทำให้ สารละลาย EPS จาก AP-1 มีความคงตัวของ การให้ความข้นหนืดในช่วง pH กว้างขึ้นอย่างมาก อาจเป็นเพราะสาร Potassium ที่ใช้ในสารละลายบัฟเฟอร์ มีส่วนช่วยในการเพิ่มความข้นหนืดของสารละลาย EPS จาก AP-1

9.1.3 ผลของเกลือต่อคุณสมบัติด้านความหนืด

สาร Electrolyte NaCl และ KCl มีผลทำให้ความหนืดของสารละลาย EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สูงขึ้น ซึ่งคาดว่าสาร Electrolyte นี้จะช่วย ในการทำให้เกิดสภาวะที่ประจุ ซึ่งช่วยทำให้เกิดการผลัดกันของโมเลกุลและช่วยทำให้โมเลกุลของ สารพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ห่างกันมากขึ้นมีผลทำให้ความหนืดสูงขึ้นเช่นเดียวกับ Xanthan gum ซึ่ง เมื่อละลายในสารละลายที่มี NaCl ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ความหนืดของสารละลายจะ เพิ่มขึ้น (Kang and Pettitt, 1993)

แต่เมื่อความเข้มข้นของ NaCl และ KCl สูงขึ้นมาก ๆ จะมีผลทำให้ พอลิแซ็กคาไรด์ไม่ละลาย เนื่องจากสารจำพวก Electrolyte นี้จะแย่งการจับกับน้ำทำให้ พอลิแซ็กคาไรด์แยกตัวออกจากน้ำ เป็นผลทำให้ค่าความหนืดลดลงและยังปริมาณเกลือสูง มากขึ้นอาจทำให้ EPS ไม่สามารถละลายได้เกิดการตกตะกอนออกมา ตัวอย่างเช่น Scleroglucan ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อราที่มีคุณสมบัติที่จะเกิดการตกตะกอน และ ไม่ละลายเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือสูงเช่นเดียวกัน (Brigand, 1993) นอกจากนี้ยังมีการใช้ NaCl และ KCl เพื่อช่วยในการเกิดเจล เช่น Gellan ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่นเดียวกัน สามารถเกิดเจลได้เมื่อมี NaCl หรือ KCl แต่เจลที่ได้จะมีความคงทนต่อการนำไป autoclave ต่ำกว่าการใช้สารจำพวก divalent คือ Mg^{2+} หรือ Ca^{2+} (Kang and Pettitt, 1993)

9.2 ผลการทดสอบความสามารถในการเป็น Emulsifier

Emulsifier เป็นสารที่ช่วยให้อิมัลชันในอาหารคงตัวโดยจะต้องมีความสมดุลระหว่างหมู่ hydrophilic และหมู่ hydrophobic พอเหมาะ แต่เนื่องจาก AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ไม่สามารถทำให้ Emulsifier คงตัวได้ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า EPS ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีความสมดุลกันระหว่างหมู่ Hydrophilic และหมู่ Hydrophobic

9.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเป็น Stabilizer

เนื่องจาก EPS ที่ผลิตได้มีค่าความหนืดค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการใช้ให้เกิดความหนืดเท่าๆ กัน เทียบกับ Xanthan gum หรือ Carrageenan ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นสาร Stabilizer โดยใช้ปริมาณเริ่มต้นเพียง 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่สามารถช่วยให้เกิดความเป็นสาร stabilizer ได้ ในขณะที่ Carrageenan ใช้เพียง 0.04 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ก็ช่วยทำให้เกิดความคงตัวได้ ในการใช้ EPS จากทั้ง 4 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็น Stabilizer จะต้องใช้ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น

บทที่ 6

ข้อสรุป

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดจำนวน 125 เชื้อ โดยแยกจากอาหารหมักดองจำนวน 97 เชื้อ และจากน้ำอ้อยจำนวน 28 เชื้อ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิต Exopolysaccharides (EPS) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็งและเหลวที่แปรชนิดของน้ำตาลคือ ซูโครส แลคโตส กลูโคส และฟรุคโตส พบว่าเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถสร้าง EPS ได้สูงสุดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมื่อนำมาศึกษาลักษณะการสร้าง EPS พบว่าการสร้าง EPS สัมพันธ์กับการเจริญ

เมื่อนำเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่า AP-1 และ AP-3 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Pediococcus pentosaceus* ส่วน LE13-1 และ LE13-2 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides* จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อศึกษาหาสูตรและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่าเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ผลิต EPS ได้น้ำหนัก EPS ต่อกรัมซูโครส สูงเมื่อใช้อาหารที่ดัดแปลงสูตรโดยประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 4, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วย Yeast extract เท่ากับ 0.5, 0.5, 0.25 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, Peptone 1.5, 1.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, Beef extract 1.0, 1.5, 1.0 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบบไม่เขย่า ในภาวะที่เหมาะสมนี้ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถผลิต EPS ได้เท่ากับ 16.32, 18.56, 9.32 และ 6.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากนั้นจึงนำสารละลาย EPS ของเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ไปทดสอบคุณสมบัติด้านความหนืด พบว่า มีลักษณะเป็นแบบ Pseudoplastic โดยให้คุณสมบัติ Shear thinning เมื่อ Shear rate สูงขึ้นความหนืดจะลดลงแต่อย่างไรก็ตามพบว่าความหนืดของสารละลาย EPS ไม่คงตัวต่ออุณหภูมิ และ pH ต่ำหรือสูงเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อละลาย EPS ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl และ KCl ตั้งแต่ 1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จะมีผลทำให้ความหนืดของสารละลายสูงขึ้น แต่ EPS ที่ผลิตได้จาก AP-1, AP-3, LE13-1 และ

จะไม่ละลายน้ำ เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการจำแนกชนิดของประจุของพอลิแซคคาไรด์ตามลักษณะประจุไฟฟ้าและชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบพบว่า EPS จากทั้ง AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 มีประจุเป็นกลางและมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 90.25, 85.20, 96.64 และ 95.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1, 0.4, 0.285 และ 0.178 ตามลำดับ และเมื่อ EPS ที่ได้จากทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปทดสอบคุณสมบัติในการเป็น Stabilizer และ Emulsifier พบว่า EPS จากทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีความสามารถในการเป็น Stabilizer และ Emulsifier แต่มีความสามารถในการเป็นสารให้ความข้นหนืด (Viscosifier) แต่เพียงอย่างเดียว



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิต EPS พบว่า EPS ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติทางด้านความเหนียวแต่ความเหนียวที่ได้ยังค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงควรนำ EPS ที่ผลิตได้ไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีเพื่อที่จะได้ทราบว่าโครงสร้างของ EPS ประกอบด้วยอะไรบ้างจึงทำให้มีคุณสมบัติดังกล่าว อีกทั้งพบว่ามีผู้สนใจศึกษาการนำ EPS ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ไปทดสอบคุณสมบัติความเป็น Antitumor ซึ่งเป็นที่น่าสนใจเพราะปริมาณ EPS ที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ แต่ถ้าหาก EPS นั้น ๆ มีคุณสมบัติเป็น Antitumor ก็จะทำให้ EPS มีมูลค่าสูงและสามารถผลิตได้ทางการค้าต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

- Andaloussi, S.A., Talbaoui, H., Marczak, R. and Bonaly, R. 1995. Isolation and Characterization of Exocellular Polysaccharides Produced by *Bifidobacterium longum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:995-1000.
- Arad, S.M., Friedman, O.D. and Rotem, A. 1988. Effect of Nitrogen on Polysaccharide Production in a *Porphyridium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 54:2411-2414.
- Atkinson, B. and Mavituna, F. 1983. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. The Nature Press: New York.
- Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K-H. 1992. The Prokaryotes, 2nd ed., Vol.II., Springer-Verlag, New York.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilization the Principle of Protein-Binding. Analytical Biochemistry. 72 : 248-254.
- Cerning, J. 1990. Exocellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87:113-130.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. and Landon, M. 1988. Exocellular Polysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 10:255-260.
- Cerning, K., 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.
- Corzo, J., Leon-Barrios, M., Hernando-Rico, V. and Gutierrez-Navarro, A.M. 1994. Precipitation of Metallic Cations by the Acidic Exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* strain BGA-1. Appl. Environ. Microbiol. 60:4531-4536.
- Crescenzi, V. 1995. Microbial Polysaccharides of Applied Interest: Ongoing Research Activities in Europe. Biotechnol. Prog. 11:251-259.

- Dasinger, B.L., McArthur, H.A.I., Lengen, J.P., Smogowicz, A.A., Miller, J.W., O'Neill, J.J., Horton, D., and Costa, J.B. 1994. Composition and Rheological Properties of Extracellular Polysaccharide 105-4 Produced by *Pseudomonas* sp. strain ATCC 53923. Appl. Environ. Microbiol. 60:1364-1366.
- de Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 23:130-135.
- de Souza, A.M. and Sutherland, I.W. 1994. Exopolysaccharide and Storage Polymer Production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. J. Appl. Bacteriol. 76:463-468.
- Doublier, J.L. and Llamas, G. 1991. Flow and Viscoelastic Properties of Mixed Xanthan gum + Galactomannan Systems. In Food Polymers, Gels and Colloids: E. Dickinson (eds). pp. 349-356. The Royal Society of Chemistry: Cambridge.
- Dubios, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebens P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 28 : 350-356.
- Garcia-Garibay, M. and Marshall, V.M.E. 1991. Polymer Production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Appl. Bacteriol. 70:325-328.
- Grobben, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R. and de Bont, J.A.M. 1995. Production of Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB2772 Growth in a Chemically Defined Medium. J. Appl. Bacteriol. 79:103-107.
- Gruter, M., Leeflang, B.R., Kuiper, J., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. 1993. Structural Characterization of the Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* rr Grown in Skimmed Milk. Carbohydr. Res. 239:209-226.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, ed. By Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. , and Holt, J.G., Williams&Wilkins Co., Baltimore, p. 1209-1234.

- Kaplan, N. and Rosenberg, E. 1982. Exopolysaccharide Distribution of and Bioemulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. Appl. Environ. Microbiol. 44:1335-1341.
- Kinery, J.S., Lee, J.B. and Mohoney, V.C. 1969. Improvements in the Dextran Assay of Cane Sugar Material. Inter Sugar J. 71: 230-233.
- Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. and Topiširovic, L. 1992. Analysis of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11, Isolated from Cheese. Appl. Environ. Microbiol. 58:4086-4088.
- Leon-Barrios, M., Gutierrez-Navarro, A.M., Perez-Galdona, diaz-siverio, J., Trujillo, J. and Corzo, J. 1992. Acidic Polysaccharide from *Bradyrhizobium (Chamecytissus proliferus)*. J.of Appli Bacteriol. 72 : 91-96.
- Linton, J.D., Ash, S.G. and Huybrechts, L. 1991. Microbial Polysaccharides. in Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources: D.Byrom (eds) pp.215-261. Stockton Press: New York.
- Linton, J.D., Evans, M., Jones, D.S. and Gouldney, D.N. 1987. Exocellular Succinoglucan Production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883. J. Gen. Microbiol. 133:2961-2969.
- 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.
- 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.
- Margaritis, A. and Pace, G.W. 1985. Microbial Polysaccharides. In Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. vol.3. The Practice of Biotechnology :

Current Commodity Products: H.W.Blanch, S.Drew and D.I.C.Wang (eds).
M.Moo-Young (chief eds.) pp.1005-1044. Pergamon Press: Oxford, New York,
Toronto, Sydney, Frankfurt.

- McDonald, L.C., Flemming, H.P. and Hanssen, H.M. 1990. Acid Tolerance of
Leuconostoc mesenteroides and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ.
Microbiol. 56: 2120-2124.
- McNeil, B. and Harvey, M.L. 1993. Viscous Fermentation Products. Viscous
fermentation Products. CRC in Biotechnology. 13(4) : 275-304.
- Norberg, A.B. and Enfors, S.-O. 1982. Production of Extracellular Polysaccharide by
Zoogloea ramigera. Appl. Environ. Microbiol. 44:1231-1237.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shu, C.-H. and Yang, S.-T. 1990. Effects of temperature on cell growth and xanthan
production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*.
Biotechnol. Bioeng. 34:454-468.
- Souw, P., and Demain, A.L. 1979. Nutritional Studies on Xanthan Production by
Xanthomonas campestris NRRL B1459. Appl. Environ. Microbiol.
37:1186-1192.
- Sutherland, I.W. 1977. Bacterial Exopolysaccharides-Their Nature and Production. In
Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell: I.W.Sutherland (ed.). pp. 27-96.
Academic Press, Inc.: New York.
- Sutherland, I.W. 1979. Enhancement of Polysaccharide Viscosity of Mutagenesis.
J. Appl. Biochem. 1:60-70.

- Tanasupawat, S. and Daengsubha, W. 1983. *Pediococcus* Species and Related Bacteria Found in Fermented Foods and Related Materials in Thailand. J.Gen. Appl. Microbiol. 29:487-506.
- Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K., Okada, S., Komagata, K, and Kozaki, M., 1992. Characterization and Identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from Fermented Foods in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 38: 121-134.
- Tanasupawat, S., Okana, S., Suzuki, K., Kozaki, M., and Komagata, K. 1993. Lactic Acid Bacteria, Particularly Heterofermentative *Lactobacilli*, Found in Fermented Foods in Thailand. Bull. JFCC. 9:65-78.
- 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
- 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., Ledebouer, 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.
- Vescovo, M., Scolari, G.L. and Bottazzi, V. 1989. Plasmid-encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Biotechnol. Lett. 2:709-712.
- Vedamuthu, E.R. and Neville, J.M. 1986. Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucooidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. Appl. Environ. Microbiol. 51:677-682.
- Williams, P.A., Clegg, S.M., Day, D.H.,Phillips, G.O. and Nishinari, K. 1991. Mixed Gels Formed with Konjac Mannan and Xanthan Gum. In Food Polymers, Gels and Colloids: E. Dickinson (eds). pp. 339-348. The Royal Society of Chemistry: Cambridge.
- Whilster, R.L. 1993. Introduction to Industrial Gums. in *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*: R.L.Whistler and J.N.BeMiller. 3rd ed. pp.1-19. Academic Press, Inc.: San Diego.

ภาคผนวก ก.

1. การย้อมสีแกรม (Hucker modification)

1.1 Ammonium oxalate crystal violet

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 Lugol's solution

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

1.3 Counterstain solution

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

วิธีการย้อม

นำสไลด์ที่ Smear เชื้อมาทำให้แห้งและ Fix โดยผ่านไอความร้อนของตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วย้อมด้วยสารละลาย Ammonium oxalate crystal violet นาน 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำแล้วหยดสารละลาย Lugol's solution ลงไปสั่ยไว้ นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง หยด Ethyl alcohol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไป Decolorize ซับให้แห้งแล้วย้อมทับด้วย 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 - Naphthylamine	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 . H ₂ O	0.01	กรัม
Tween 80	0.10	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียม Arginine agar

Peptone	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
K ₂ HPO 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

ภาคผนวก ข

1. การหาน้ำหนักเซลล์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Van den Berg *et al.*, 1995)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มครบ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนของเซลล์มาทำการเจือจางได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตั้งแต่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 แล้วจึงนำสารละลายนี้ไปหาน้ำหนักแห้ง โดยปิเปตสารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ กัน เดิมลงใน ถ้วย 10 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ใน Dessicator แล้วชั่งน้ำหนักของถ้วยที่แน่นอน) นำไประเหยน้ำออกบน water bath แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วใส่ใน Dessicator และนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์

การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบ 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังจากปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว นำไปคำนวณหรือเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์

การคำนวณ

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ = ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ - ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว

2. การหาปริมาณเอกโซพอลิแซคคาไรด์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Kinery *et al.*, 1969)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

EPS ที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นเจือจาง แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของ EPS

การวิเคราะห์หาน้ำหนักของ EPS

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบ 48 ชั่วโมง ไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
2. นำไปตกตะกอนแยกพอลิแซคคาไรด์ โดยบีบเปิดสารละลายส่วนใส 1 ส่วน ใส่ลงในหลอดทดลองให้เอทธานอลความเข้มข้น 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

3. การหาค่าความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer

วิธีทำ

1. นำตัวอย่างที่ต้องการวัดค่าความหนืดใส่ลงใน cup วัดความหนืดของเครื่อง (ปริมาตรที่ใส่ขึ้นอยู่กับขนาดของเข็มวัด 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

ภาคผนวก ค.

1. ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda *et al.*, 1981)

นำ EPS ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล เติมน้ำสารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (2 มิลลิกรัม ของ EPS ต่อ 2-3 มิลลิลิตร ของ CPC) บ่มที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตตะกอนในสารละลายถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharides) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharides) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดตะกอน EPS ขึ้นอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 39



(A)

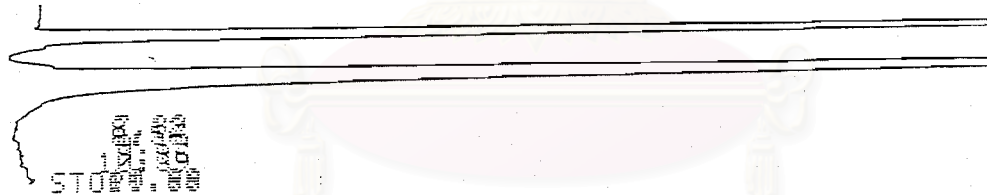
(B)

รูปที่ 39 แสดงการทดสอบชนิดประจุเมื่อมีประจุแบบ Acidic polysaccharides (A) และ Neutral Polysaccharides (B)

2. การทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของ EPS
(ดัดแปลงจากวิธีของ Leon-Barrios *et al.*, 1992)

นำ EPS 20 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ปิดแน่น จุ่มลงในน้ำเดือดนาน 7 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทำให้เย็นและทำให้เป็นกลางโดยใช้ NaOH นำสารละลายส่วนใดก็ได้เก็บไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex Spherisorb-NH₂ 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 40-43

START 06.03.14.21.



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 40 แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 เมื่อทำการย่อย
สลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

START 06.03.15.40.

3.53
 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 41 แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 เมื่อทำการย่อย
 สลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

START 03.03.14.38.

1.03
 2.03
 4.57
 STOP 7.37

C-R1A
 SMPL # 00
 FILE # 1
 REPT # 4364
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.03	0.2615		6665
0		2.03	98.6357		2513906
0		4.57	0.447	V	11393
0		4.97	0.2579	V	6573
0		5.33	0.3171	V	8082
0		7.03	0.0494		1261
0		7.37	0.0311	V	794
	TOTAL		100		2548676

รูปที่ 42 แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-1 เมื่อทำการย่อย
 สลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

4.31
METHOD 5:041
STOP

C-RIA
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 4362
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.99	99.3268		2567845
0		4.31	0.0319		826
0		4.91	0.4469	V	11554
0		5.97	0.0621		1606
0		6.61	0.132	V	3414
TOTAL			99.9999		2585246

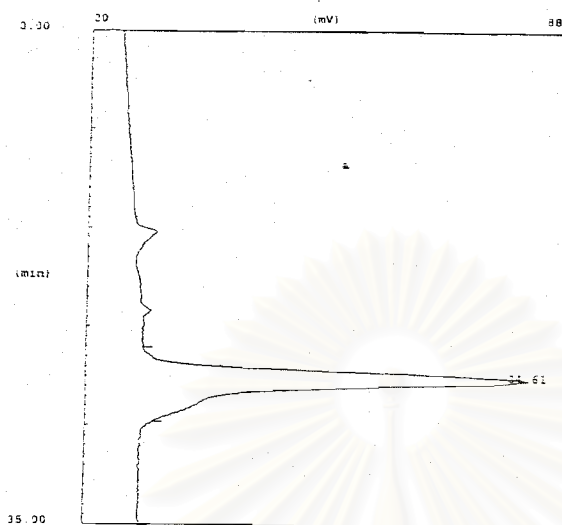
รูปที่ 43 แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ LE13-2 เมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรด จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3. การทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของ EPS

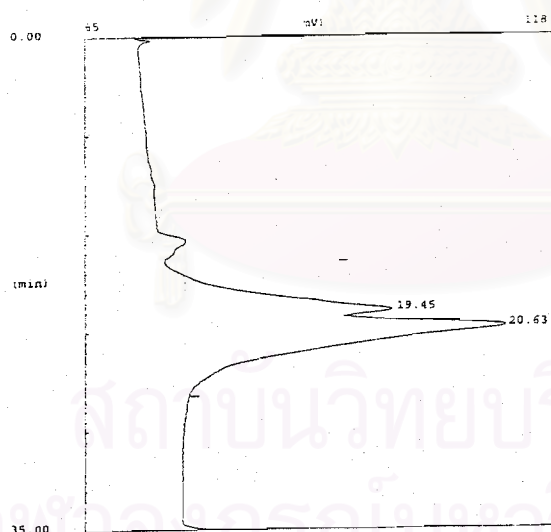
นำ EPS ที่ละลายในน้ำกลั่นจนหมดไปฉีดเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง High performance size exclusion chromatography โดยใช้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ของสารตัวอย่าง โดยมีการใช้คอลัมน์ชนิด Altra hydrogel HPSEC columns ขนาด 7.8 mm. X 30 cm มีภาคน้ำพา (Mobile phase) เป็น Deionized water อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจสอบโดยใช้ Detector 3 เครื่อง คือ Altra hydrogel 120 จำนวน 2 เครื่อง และ Altra hydrogel linear 1 เครื่อง ดังแสดงผลดังรูปที่ 44 และ 45 และการวิเคราะห์ผลดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 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	4×10^7	2×10^5
AP-3	20.63	6.802	6×10^6	39149



รูปที่ 44 แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-1 จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC



รูปที่ 45 แสดงโครมาโตแกรมของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ AP-3 จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC

4. การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของ EPS (Dubios *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

วิธีการทดลอง

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

การทำกราฟมาตรฐาน

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

5. การทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ EPS (Bradford, 1976)

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Coomassie blue

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

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (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 31 เติมน้ำจนได้สารละลายโปรตีน 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie blue 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

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

ตารางที่ 31 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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย