เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในน้ำสลัด

นางสาววิชชุดา วิไลรัศมี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND ITS APPLICATION IN SALAD DRESSING

Miss Wichuda Wilairussamee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในน้ำสลัด
โดย	นางสาววิชชุดา วิไลรัศมี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

…… กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

วิชชุดา วิไลรัศมี : เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในน้ำสลัด. (EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND ITS APPLICATION IN SALAD DRESSING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล, 144 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากผักดองโดยคัดแยกได้ 8 ไอโซเลต คือ L01- L08 จากการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดมีสมบัติคล้ายกัน คือ มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคส ละลายน้ำได้ปานกลาง ยกเว้น พอลิแซ็กคาไรด์จาก L07 ที่ละลายน้ำได้ดี มีความหนืดต่ำ มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ และมีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม นอกจากนี้พบว่า L06 และL07 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด เท่ากับ 11.20 และ11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จึงได้คัดเลือกไอโซเลต L06 และ L07 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานและศึกษาสมบัติเพิ่มเติม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน พบว่า ไอโซเลต L06 และ L07 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Weissella* จากการศึกษาสมบัติเพิ่มเติมพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 ไม่สามารถก่อเจล มีประจุเป็นกลาง มีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดี สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้ดี ทนความร้อนได้สูง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มีพฤติกรรมการไหลเป็นชนิด non- Newtonian pseudoplastic และมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน คือ 2.8 x10^3 และ 3.3 x10^3 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสมบัติทั้งหมดแล้วพบว่า สมบัติที่เหมาะสมและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารได้ คือ ความเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความสามารถคงตัวอิมัลชัน จึงได้นำ พอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 0.4% โดยมวลต่อปริมาตร ไปประยุกต์ในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอกพบว่า ขนาดอนุภาคของอิมัลชันในน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 เท่ากับ 2.44 และ 2.92 ไมโครเมตร ตามลำดับ และคงตัวอิมัลชันในน้ำสลัดได้นาน 1 วัน ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 จึงสามารถเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ และสารคงตัวอิมัลชันสำหรับการประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหาร

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5472099823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES / CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS

WICHUDA WILAIRUSSAMEE : EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND ITS APPLICATION IN SALAD DRESSING. ADVISOR : ASSOC.PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASST.PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL , Ph.D., 144 pp.

In the present study, exopolysaccharide (EPS) producing-lactic acid bacteria (LAB) were isolated from Thai fermented vegetables with eight isolates; L01 – L08 were obtained. Chemical and Physical properties of EPSs were study the results of which revealed that EPSs from L01–L08 possessed similar properties of consisting glucose, partly soluble while L07 was totally soluble. All EPSs showed low viscosity and low water holding capacity. These EPSs displayed as good emulsifying activity as xanthan gum. The highest EPS producers were isolate L06 and L07 at 11.20 and 11.40 g/l, respectively. Thus, L06 and L07 were selected for further studies. Taxonomic studies and 16S rDNA analysis classified isolate L06 and L07 as member of genus *Weissella*. Further characterization demonstrated that EPSs from L06 and L07 did not form gel, neutral charge, were able to form good flocculation and form emulsion in olive oil with good stability, able to with hold high temperature, good antioxidant, exhibiting a non-Newtonian pseudoplastic behavior with molecular weight of 2.8×10^3 and 3.3×10^3 Dalton, respectively. EPS from isolate L06 and L07 (0.4% w/v) was employed as ingredient in salad dressing along with olive oil. The salad dressing obtained particle sizes of 2.44 and 2.92 micrometer for L06 and L07, respectively and able to stabilize such emulsion for 1 day. Judging from the above properties, EPS from strain L06 and L07 with their indicated emulsifying properties and emulsion stabilization made them suitable for application in food.

Department : Microbiology Student's Signature.....

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature.....

Academic Year : 2012 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดทั้งช่วยปรับปรุงและแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน และอาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนปรับปรุงเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอบกราบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบโคร่งร่างวิทยานิพนธ์ รวมทั้งกำลังใจ และความช่วยเหลือต่างๆ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาคจุลชีววิทยาที่ให้ความรู้ต่างๆ และเจ้าหน้าที่บนภาควิชาจุลชีววิทยา และภาคเทคโนโลยีทางการอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้ความเอ็นดู จนทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา เพื่อสนับสนุนทุนการศึกษาในระดับปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ขอขอบคุณพี่ๆน้องๆห้อง407และห้อง448 ตลอดทั้งพี่ๆน้องๆเพื่อนๆบนภาคจุลชีววิทยาทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ในการทำวิจัย ให้รอยยิ้มและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนในการเรียนต่อปริญญาโท และกำลังใจจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฑ

บทที่

1 บทนำ……... 1

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์……. 3

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ……. 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……... 3

2 ปริทัศน์วรรณกรรม…… 4

2.1 พอลิเมอร์ และไบโอพอลิเมอร์…….. 4

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์…… 6

2.3 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์…….. 9

2.4 แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย.. 16

2.5 ลักษณะสมบัติและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆของพอลิแซ็กคาไรด์…….……. 23

2.6 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของพอลิแซ็กคาไรด์…… 29

2.7 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์…….. 32

2.8 สมบัติการไหล…….. 34

2.9 อิมัลชัน……. 36

บทที่		หน้า
3	อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง…….……	41
	3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง…….	41
	3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง……	43
	3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย……..	46
	3.3.1 การคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากผักดอง……..	46
	3.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาและการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย….....	46
	3.3.3 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย……..	47
	3.3.4 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดที่คัดแยกได้……	47
	3.3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์.	48
	3.3.6 การคัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่เหมาะสม……..…	51
	3.3.7 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก……..	51
	3.3.8 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแบคทีเรียที่คัดเลือก…….	54
	3.3.9 การคัดเลือกสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในอาหาร……..	57
	3.3.10 การประยุกต์ในน้ำสลัด……	57
4	ผลการทดลอง……..……..……..	59
	4.1 การคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ได้จากผักดอง……	59
	4.2 สัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก…..	62
	4.3 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้…….	62

บทที่		หน้า
	4.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์……..	64
	4.4.1 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์……	64
	4.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์……...	67
	4.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีPhenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)…….……	67
	4.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)……..	67
	4.4.3 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์……	68
	4.4.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำ…….	69
	4.4.5 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์……..	70
	4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาและเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก……...	73
	4.5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก…….....	73
	4.5.2 เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก……..…...	75
	4.5.2.1 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น…….	75
	4.5.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA……..	76
	4.6 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก…….....	78
	4.6.1 ความสามารถการเกิดเจล……...	78
	4.6.2 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์……	78
	4.6.3 ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์……..	79
	4.6.4 ความคงตัวของอิมัลชัน…….....	80

บทที่		หน้า
	4.6.5 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA) …….....	85
	4.6.6 น้ำหนักมวลโมเลกุล…….....	87
	4.6.7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ……	89
	4.6.8 การวัดความหนืด……...	90
	4.7 การคัดเลือกสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในอาหาร ……..	91
	4.8 การประยุกต์ในน้ำสลัด…….....	93
	4.8.1 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และขนาดอนุภาคของอิมัลชัน……..	93
	4.8.2 ความคงตัวของอิมัลชันในน้ำสลัด……..……	94
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง…….…….....		97
รายการอ้างอิง…….....		112
ภาคผนวก…….....		126
	ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ…….	127
	ภาคผนวก ข สารเคมี…….....	130
	ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน…….....	132
	ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์…….....	133
	ภาคผนวก จ ผลของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นน้ำตาลสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์…….….....	135
	ภาคผนวก ฉ สมบัติความเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07…….....	136
	ภาคผนวก ช ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ……..	137
	ภาคผนวก ซ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต L06 และ L07…….....	140
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….....		144

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ไบโอพอลิเมอร์ที่พบในธรรมชาติและหน้าที่ของไบโอพอลิเมอร์ต่างๆ……..	5
2.2	ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ…….	7
2.3	หน้าที่ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อจุลินทรีย์ที่ผลิต……	10
2.4	องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์……..	15
2.5	ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย…….	19
2.6	เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย……..	20
2.7	สมบัติทางเคมีกายภาพ และการนำไปประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า……	26
2.8	การประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ…….	28
2.9	ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอาหาร…..……	29
2.10	ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่ประยุกต์ใช้ในอาหาร….	31
2.11	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม……	32
2.12	สารคงตัวในมายองเนสและสลัดครีมที่อนุญาตใช้โดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.)……..	38
4.1	จำนวนไอโซเลตของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่คัดแยกได้จากผักดองทั้งหมด……..……..	59
4.2	ลักษณะโคโลนีของแล็กติกแอซิดที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่คัดแยกได้จากหน่อไม้ดอง……..……..……..……	60
4.3	การย้อมแกรม และการทดสอบเอนไซม์แคทาเลสของไอโซเลต L01 - L08	62
4.4	การเปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08……..……...	63
4.5	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L01- L08 หลังจากย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลาย 80% โดยปริมาตร อะซิโตรไทร์ลเป็นตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที……..……..……..……...	65

ตารางที่		หน้า
4.6	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 - L08……	67
4.7	ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 - L08 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง……..…….....	68
4.8	เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 -L08..	69
4.9	ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก แล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 –L08 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กับน้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วน 1:1……	70
4.10	ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08……....	72
4.11	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07……....	73
4.12	ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07……..….	75
4.13	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต L06 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank ……...…….	76
4.14	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต L07 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank ……...	77
4.15	ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06, L07 และแซนแทนกัมกับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน……...	80
4.16	ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06, L07 และแซนแทนกัมกับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน……..……	83
4.17	น้ำหนักมวลโมเลกุลและเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ของสารมาตรฐานพลูลูแลน……..…….....	87

ตารางที่ หน้า

4.18 ค่า %DPPH radical scavenging activity ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06, L07 และแซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 89

4.19 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (d_{32}; volume-surface mean diameters) ของอิมัลชันในน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ ในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัมและพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07..... 94

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะโครงสร้างต่างๆของพอลิเมอร์.....	4
2.2	โครงสร้างของแป้งในพืช.....	8
2.3	โครงสร้างของอัลจิเนตที่ผลิตจากสาหร่ายสีน้ำตาล.....	9
2.4	ตำแหน่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ.....	10
2.5	โครงสร้างของเดกซ์แทรน.....	12
2.6	โครงสร้างของเซลลูโลส.....	13
2.7	โครงสร้างของลีแวน.....	13
2.8	โครงสร้างของเจลแลน.....	14
2.9	โครงสร้างของแซนแทน.....	14
2.10	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย.....	21
2.11	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย.....	21
2.12	ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพและการนำไปประยุกต์ใช้.....	24
2.13	หลักการเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี.....	34
2.14	แบบจำลองก้อนของไหลเมื่อได้รับแรงกระทำ.....	35
2.15	ลักษณะการไหลของของเหลว.....	36
2.16	กลไกความไม่คงตัวของอิมัลชัน.....	40
4.1	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเศลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.....	61
4.2	การเปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียไอโซเลต L01- L08 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง.....	64

รูปที่		หน้า
4.3	โครมาโทแกรมแสดงสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L06 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที…….….	66
4.4	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS……..	74
4.5	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มี 4 % น้ำตาลซูโครส……	74
4.6	ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า…….……	74
4.7	ตัวอย่างผลวิเคราะห์ชนิดประจุของ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 แซนแทนกัม (ชุดควบคุมบวก) และ สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมลบ) ……..	78
4.8	สมบัติความเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 0.2–1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร……..	79
4.9	ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06 กับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1– 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน…….	81
4.10	ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L07 กับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1– 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน…….….	81
4.11	ความคงตัวของอิมัลชันของแซนแทนกัมกับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน……...	82
4.12	ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06 กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน……	83

รูปที่		หน้า
4.13	ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L07 กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน……..	84
4.14	ความคงตัวของอิมัลชันของแซนแทนกัม กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน……..	84
4.15	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส……	86
4.16	โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L07 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส……	86
4.17	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพูลลูแลนที่น้ำหนักมวลโมเลกุลต่างๆ จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที……..	88
4.18	โครมาโทแกรมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที……..	88
4.19	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.05–300 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06……..	90
4.20	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.05–300 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L07……..	90
4.21	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.05–300 วินาที$^{-1}$ ของแซนแทนกัม……..	91
4.22	ลักษณะอิมัลชันในน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ และที่มีแซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L06 และ L07 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า ภายหลังการเกิดอิมัลชัน 24 ชั่วโมง……	93

รูปที่		หน้า
4.23	ความคงตัวของอิมัลชันของน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ และที่มีแซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L06 และ L07 ในวันที่ 1.....	95
4.24	เปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อความสูงอิมัลชันทั้งหมด (%serum) ของน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ น้ำสลัดที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ในวันที่ 0 ถึง วันที่ 9.....	95

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก มีการส่งออกต่างประเทศเพิ่มขึ้น เนื่องจากความต้องการในการบริโภคของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งประเทศไทยมีนโยบายที่จะเป็น “ครัวของโลก” จึงจำเป็นต้องพัฒนาความสามารถในการผลิตเพื่อแข่งขันกับประเทศอื่น แม้ว่าประเทศไทยจะมีข้อได้เปรียบในแง่ของวัตถุดิบ แต่อุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ยังมีการเติมสารเติมแต่งเข้าไปเพื่อเพิ่มคุณภาพและคุณค่าทางอาหาร สารเหล่านี้ยังคงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนการผลิตนั้นยังสูงอยู่ สารที่ใช้บางชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ซึ่งมีต้นทุนการผลิตไม่สูงมาก และสามารถผลิตขึ้นใช้เองได้ ดังนั้นหากสามารถผลิตและพัฒนาสารเติมแต่งเหล่านี้ได้เองจะลดต้นทุนการผลิตลงได้ และเป็นการสร้างงานในประเทศตลอดจนเป็นการเพิ่มความรู้และศักยภาพในการผลิตและการวิจัยในประเทศได้ด้วย

หนึ่งในสารเติมแต่งที่ใช้กันมากคือ ไบโอพอลิเมอร์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ (Herdman, 1993) ตัวอย่างของไบโอพอลิเมอร์ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นมอโนแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก สามารถแบ่งออกเป็นสองประเภท คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลชนิดเดียวกัน และ เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่มีหน่วยย่อยน้ำตาลต่างชนิดกัน พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ จุลินทรีย์และสาหร่าย เป็นต้น (Venugopal, 2011) จุลินทรีย์จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ในรูปของแคปซูล หรือ จะถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความข้นหนืด เรียกพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้ว่า พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ หรือ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide หรือ EPS) (De Vuyst และ Degeest, 1999) ซึ่งสกัดและแยกออกจากผนังเซลล์ได้ง่าย จึงเป็นที่นิยมนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Sandford, 1979)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบและสมบัติที่แตกต่างกันไป ด้วยสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ที่คล้ายกับพืชและสาหร่าย จึงสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อ

เป็นสารเติมแต่งสำหรับเพิ่มคุณลักษณะต่างๆ ให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เป็นสารให้ความข้นหนืด (viscosifying) สารให้ความคงตัว (stabilizing) สารก่อเจล (gelling) และสารก่ออิมัลชัน (emulsifying) เป็นต้น (Jolly และคณะ, 2002) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีก เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก ผลิตภัณฑ์ซักผ้า สิ่งทอ กาว กระดาษ สี อาหาร ยา เครื่องสำอางค์ และอื่นๆ (Prasertsan และคณะ, 2006)

งานวิจัยที่ผ่านมาในห้องปฏิบัติการเดียวกัน โดยสมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ได้คัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างอ้อย และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 8.75 กรัมต่อลิตร ในภาวะการเลี้ยงเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ EN02 ทางอนุกรมวิธาน พบว่า เป็น *Enterobacter cloacae* ต่อมา ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์ (2552) ได้คัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 จากตัวอย่างผลไม้ โดยมีประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 2.38 กรัมต่อลิตร และจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 ทางอนุกรมวิธาน พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* จะเห็นว่าจากงานวิจัยข้างต้นแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค อาจไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย ทั้งนี้จากการรายงานของหลายงานวิจัยก่อนหน้า(Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) พบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

แล็กติกแอซิดแบคเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) จัดเป็น Food-Grade Bacteria และได้รับการรับรองว่าเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) คือมีความปลอดภัยในการบริโภค (Mogensen และคณะ, 2002) ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจึงจัดว่าปลอดภัยในการบริโภคเช่นกัน และผลิตภัณฑ์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียนี้จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับคนและสัตว์ (Wang และคณะ, 2010) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงและเพิ่มความข้นหนืด เนื้อสัมผัส และการรับรู้รสชาติในอุตสาหกรรมนม รวมถึงโยเกิร์ตและชีส (Garai-Ibabe และคณะ, 2010) โดยพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้สามารถเป็นตัวเลือกที่จะนำไปใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด สารก่ออิมัลชัน สารก่อเจล และสารเพิ่มความคงตัว (Laws และ Marshall, 2001;

Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียในกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคเรีย

เนื่องจากสมบัติทางกายภาพและเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์มีความหลากหลายและแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาให้ทราบสมบัติเบื้องต้นเพื่อนำไปเลือกการประยุกต์ให้เหมะสม (Wang และคณะ, 2010) โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาสมบัติต่างๆของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ความสามารถในการอุ้มน้ำ และความสามารถในการก่อเจล เป็นต้น และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ เลือกสมบัติเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในชนิดของอาหารโดยเหมาะสมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

คัดแยกและคัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ และศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อเลือกไปประยุกต์ในอาหารได้อย่างเหมาะสม

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1. เก็บตัวอย่างและคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากธรรมชาติ
2. ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3. ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์
4. คัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่เหมาะสม
5. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก
6. ศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก
7. คัดเลือกสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในอาหาร
8. ประยุกต์ใช้ในน้ำสลัด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

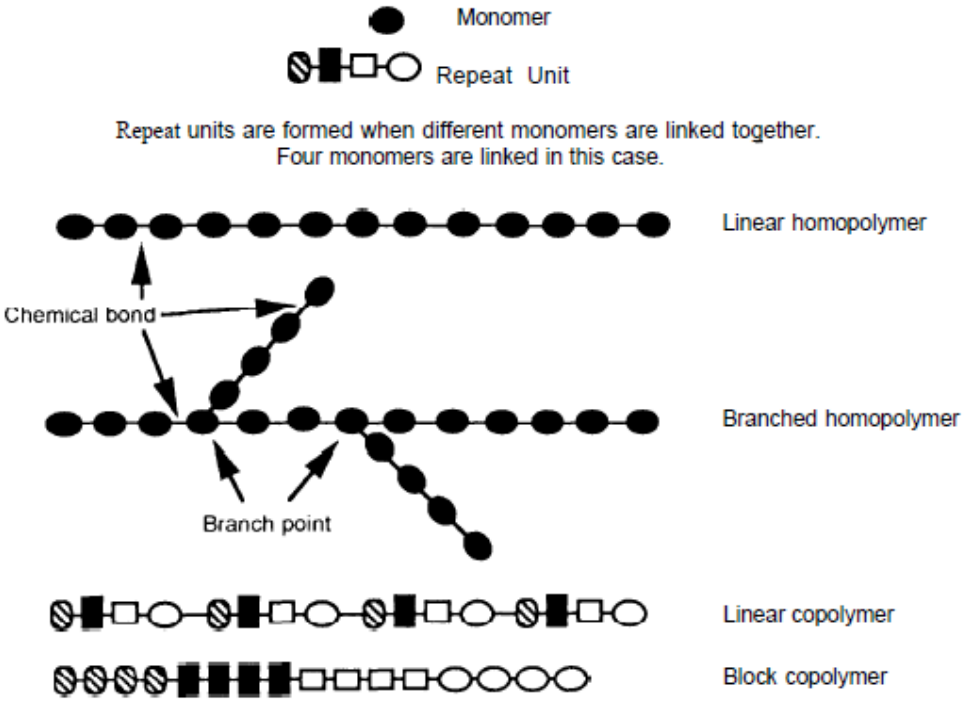
ได้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และทราบลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถนำไปประยุกต์ในอาหาร อย่างเช่น น้ำสลัดได้

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิเมอร์ (polymer) และไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer)

พอลิเมอร์ คือ โมเลกุลที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ (monomer) หรือหน่วยย่อยซ้ำ (repeat units) ต่อกันเป็นสายยาว แสดงดังรูปที่ 2.1 โดยพอลิเมอร์แบ่งออกเป็นสองประเภท ได้แก่ ฮอมอพอลิเมอร์ (homopolymer) ที่เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ชนิดเดียวกัน และโคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่ต่างชนิดเชื่อมต่อกัน กระบวนการที่ทำให้มอนอเมอร์ต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์เกิดได้จากปฏิกิริยาทางเคมีหรือปฏิกิริยาทางชีวภาพ เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการเกิดพอลิเมอร์ หรือ polymerization โครงสร้างพอลิเมอร์สามารถเป็นสายตรง (linear) และ กิ่งก้าน (branched) (รูปที่ 2.1) (Herdman, 1993)



รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างต่างๆของพอลิเมอร์

ที่มา : Herdman (1993)

ไบโอพอลิเมอร์ คือ พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทางชีวภาพ (Biological systems) ในธรรมชาติระหว่างวงจรการเจริญ (Growth cycle) ของสิ่งมีชีวิต (Chandra และ Rustgi, 1998) เช่น จุลินทรีย์ พืช และ สัตว์ และในอีกความหมายหนึ่งคือ พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยใช้สารตั้งต้นจากชีวภาพ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล และไขมันธรรมชาติ เป็นต้น (Herdman, 1993) ตัวอย่างไบโอพอลิเมอร์ แสดงดังในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ไบโอพอลิเมอร์ที่พบในธรรมชาติและหน้าที่ของไบโอพอลิเมอร์ต่างๆ

พอลิเมอร์	**มอนอเมอร์**	**หน้าที่**
นิวคลีอิกแอซิด (ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ)	นิวคลีโอไทด์	บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต
โปรตีน	กรดอะมิโน	ตัวเร่งปฏิกิริยา (เอนไซม์) Growth factor ฮอร์โมน (อินซูลิน) แอนติบอดี เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างต่างๆ (หนัง ขน เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน)
พอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาล	เป็นโครงสร้างของพืชและสัตว์บางชนิด (เซลลูโลส,ไคติน) แหล่งสะสมพลังงาน (แป้ง,ไกลโคเจน)
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHA)	กรดไขมัน	แหล่งสำรองพลังงานของจุลินทรีย์
พอลิซัลเฟต	ซัลเฟต	แหล่งสะสมพลังงานอนินทรีย์

ที่มา : Herdman (1993)

2.2 **พอลิแซ็กคาไรด์** (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีโครงสร้างซับซ้อน จัดอยู่ในสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โดยประกอบด้วยน้ำตาลชนิดโมเลกุลเดี่ยว หลายโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Izydorczyk และคณะ, 2005) ส่วนใหญ่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง สามารถละลายน้ำได้ และเมื่อละลายในน้ำจะก่อความหนืดขึ้น (Ying และคณะ, 2006) พอลิแซ็กคาไรด์อาจมีโครงสร้างเป็นสายตรงหรือกิ่งก้านหรือทั้งสองชนิด ความแตกต่างของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำตาลชนิดโมเลกุลเดี่ยว ความยาวของสาย และจำนวนการแตกกิ่งก้าน สูตรโมเลกุลทั่วไปของ พอลิแซ็กคาไรด์ คือ $C_x(H_2O)_y$ ส่วนใหญ่พอลิแซ็กคาไรด์จะประกอบด้วยน้ำตาลชนิดโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม จึงมีสูตรโมเลกุล คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบ เช่น D-กลูโคส D-ฟรุกโทส D-กาแล็กโทส D-แมนโนส ในกลูแคน ฟรุกแทน กาแล็กแทน และแมนแนน ตามลำดับ ในขณะที่บางชนิดอาจประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทส เช่น L-อะราบิโนส และ D-ไซโลส ในอะราบิแนน และเฮมิเซลลูโลส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอนุพันธุ์ของน้ำตาลชนิดโมเลกุลเดี่ยว เช่น D-กลูโคซามีน D-กาแลกโตซามีน N-อะซิติลนิวรามินิกแอซิด N-อะซิติลมิวรามิกแอซิด กลูคูโรนิก และ ยูโรนิกแอซิด เป็นต้น (Venugopal, 2011) พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น สัตว์ พืช สาหร่าย และจุลินทรีย์ ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ต่างๆ เช่น ไคติน เซลลูโลส อัลจิเนต และ แซนแทน เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 2.2 หน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญ 2 อย่าง คือ เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง เช่น เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืชและสาหร่ายสีเขียว ไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา ยีสต์ และสาหร่ายบางชนิด และยังเป็นองค์ประกอบของเปลือกของสัตว์น้ำ พวกกุ้ง ปู และสัตว์จำพวกแมลง และอีกหน้าที่ คือ เป็นแหล่งสะสมพลังงาน เช่น แป้ง เป็นแหล่งสะสมพลังงานในพืช และไกลโคเจนเป็นแหล่งสะสมพลังงานในสัตว์ (Herdman, 1993; Izydorczyk และคณะ, 2005)

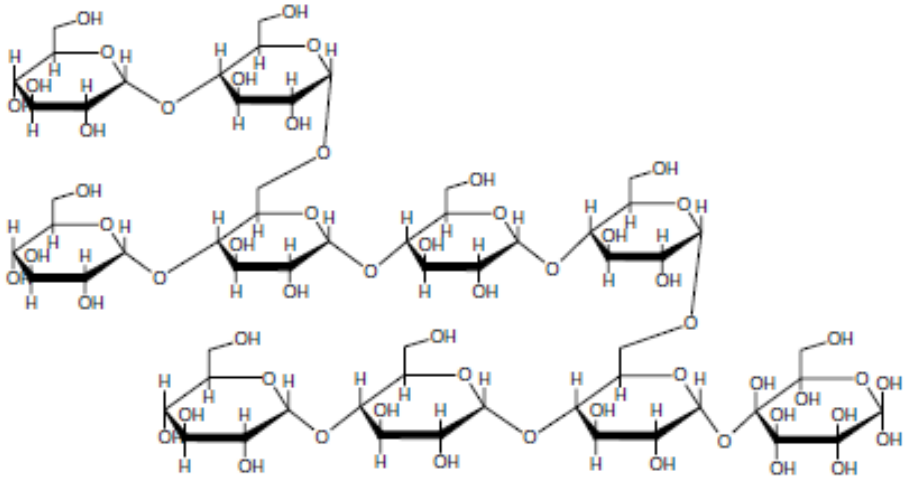
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	พอลิแซ็กคาไรด์
แบคทีเรีย	แซนแทน (Xanthan) เดกซ์แทรน (Dextran) เจลแลน (Gellan) ลีแวน (Levan) เคอร์ดแลน (Curdlan)
รา	พูลลูแลน (Pullulan) อัลซิแนน (Elsinan)
พืช/สาหร่าย	แป้ง (starch) เซลลูโลส (Cellulose) วุ้น (Agar) อัลจิเนต (Alginate) คาราจีแนน (Carragenan)
สัตว์	ไคติน (Chitin) กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) อิมัลแซน (Emulsan)

ที่มา : Herdman (1993)

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถจัดจำแนกออกเป็น 2 ประเภท ตามความแตกต่างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Badel และคณะ, 2011) ดังนี้

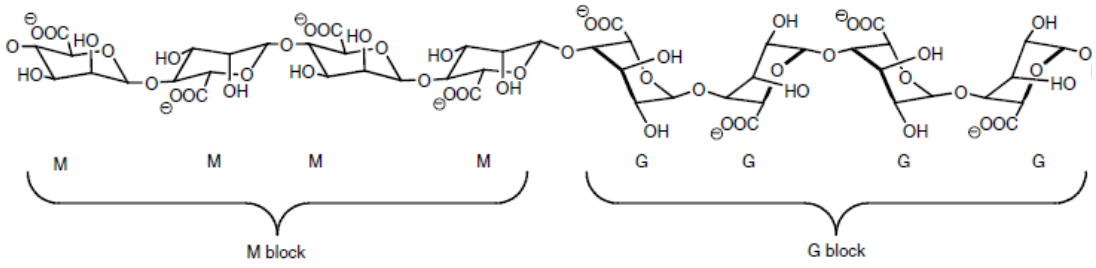
1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นชนิดเดียวกัน เช่น เซลลูโลส แป้ง เดกซ์แทรน ลีแวน เคอร์ดแลน อัลซิแนน และ พูลลูแลน เป็นต้น (Sutherland, 1990) ตัวอย่างโครงสร้างของฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ โครงสร้างของแป้ง แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของแป้งในพืช
ที่มา : Emery และ Sanders (2003)

แป้งจะประกอบด้วยโมเลกุล 2 ชนิด ได้แก่ อะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพกติน (amylopectin) โดยทั้งคู่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส ในแป้งจะพบอะไมโลส ประมาณ 20-30% และ อะไมโลเพกติน ประมาณ 70-80% โครงสร้างอะไมโลส พบว่า กลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,4 เป็นสายตรงยาว ส่วนโครงสร้างอะไมโลเพกตินไมโลส กลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,4 และแตกแขนงโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,6 (Emery และ Sanders, 2003)

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่างชนิดกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น อัลจิเนต เจลแลน แซนแทน และไฮยาลูโรนิกแอซิด เป็นต้น (Sutherland, 1990) ตัวอย่างโครงสร้างเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ อัลจิเนต แสดงในรูปที่ 2.3



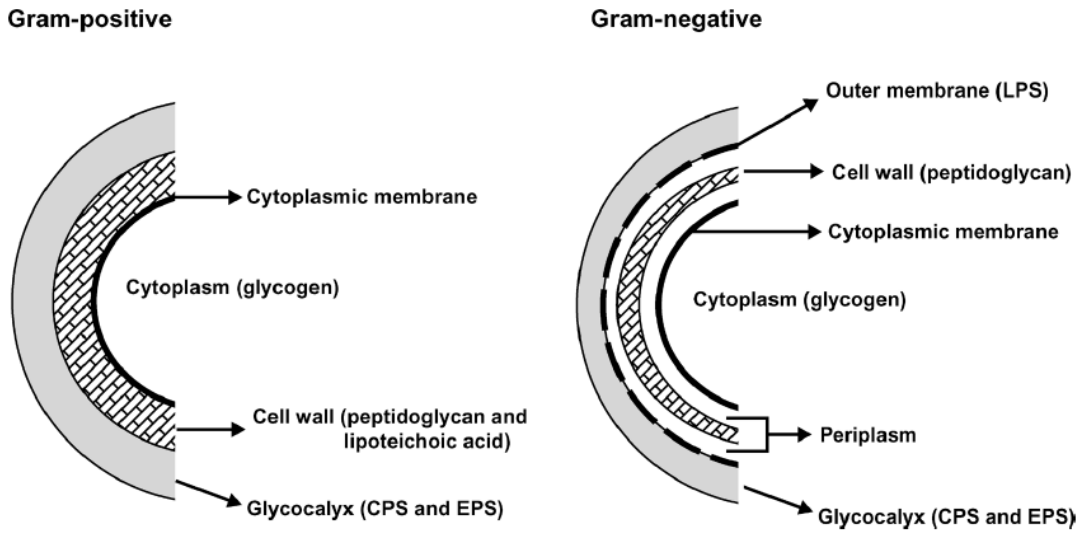
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของอัลจิเนต (alginate) ที่ผลิตจากสาหร่ายสีน้ำตาล

ที่มา : Izydorczyk และคณะ (2005)

อัลจิเนต มีโครงสร้างที่ไม่แตกแขนง ต่อกันเป็นสายยาว โดยประกอบด้วย β-D-แมนนูโรนิกแอซิด (M) และ α-L-กูลูโรนิกแอซิด (G) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,4 (Izydorczyk และคณะ, 2005)

2.3 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น (Wang และคณะ, 2010) พอลิแซ็กคาไรด์ที่จุลินทรีย์ผลิตมีหน้าที่หลากหลาย เช่น เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมอยู่ในไซโตพลาสซึม เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ หรือ เป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ หรือ ปล่อยออกนอกเซลล์ (Farnworth และคณะ, 2006) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์โดยจุลินทรีย์ เรียกว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) หรือ EPS โดยจะปล่อยออกมาระหว่างการเจริญ และเกาะอยู่บนผิวเซลล์อย่างหลวมๆ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะทำให้เซลล์มีลักษณะเป็นเมือก (Sutherland, 1972; Sutherland, 1977) ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกาะอยู่บนผิวเซลล์อย่างถาวรจะเรียกว่า แคปซูล (capsular polysaccharide) (Sutherland, 1985) แสดงดังรูปที่ 2.4 เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์นั้นมีหน้าที่สำคัญและมีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่ผลิตหลายอย่าง แสดงดังตารางที่ 2.3 นอกจากนี้พบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ไม่เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนแก่จุลินทรีย์ที่ผลิต (Ruas-Madiedo และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.4 ตำแหน่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ CPS = Capsular polysaccharides (capsule), EPS = exopolysaccharides (slime layer) ที่มา: Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan (2005)

ตารางที่ 2.3 หน้าที่ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อจุลินทรีย์ที่ผลิต

ปกป้องเซลล์ต่อสิ่งต่างๆ	หน้าที่อื่นๆ
ความแห้ง (Desiccation) ฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) ไวรัส (Phage attack) แอนติไบโอติก (Antibiotics) แรงออสโมติก (Osmotic stress) ไอออนของโลหะ (metal ions) แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)	เกี่ยวกับการจดจำของเซลล์ (cell recognition) ช่วยในการเกาะบนพื้นผิว ช่วยในการสร้างไบโอฟิล์ม

ที่มา : Farnworth และคณะ (2006)

ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากพืช (เซลลูโลส เพกติน และ แป้ง) และสาหร่าย (อัลจิเนต และ คาราจีแนน) แต่พบว่าปริมาณที่ผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการทางอุตสาหกรรมจึงได้สนใจใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์แทน เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์บางชนิดมีสมบัติที่คล้ายกับพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชและสาหร่าย (Laws และคณะ, 2001; Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) สามารถผลิตได้ในปริมาณสูง ขั้นตอนในการสกัดทำได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถผลิตได้ในทุกสภาพอากาศโดยไม่ต้องคำนึงถึงฤดูกาลและสภาพอากาศเหมือนที่ผลิตจากพืชและสาหร่าย (Yun และ Park, 2003) แต่สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้ พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร คือ ความปลอดภัย (Laws และคณะ, 2001) ตัวอย่างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ เดกซ์แทรน ที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดแรกที่จัดว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า (Sutherland, 2006) แซนแทนกัมโดย *Xanthomonas campestris* ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นๆเป็นจำนวนมาก และ เจลแลนที่ผลิตโดย *Sphingomonas paucimobilis* ทั้งแซนแทนกัมและเจลแลน ได้รับการรับรองจาก FDA ของสหรัฐอเมริกา ว่ามีความปลอดภัยสำหรับนำไปใช้กับอาหารได้ (Morris, 2006)

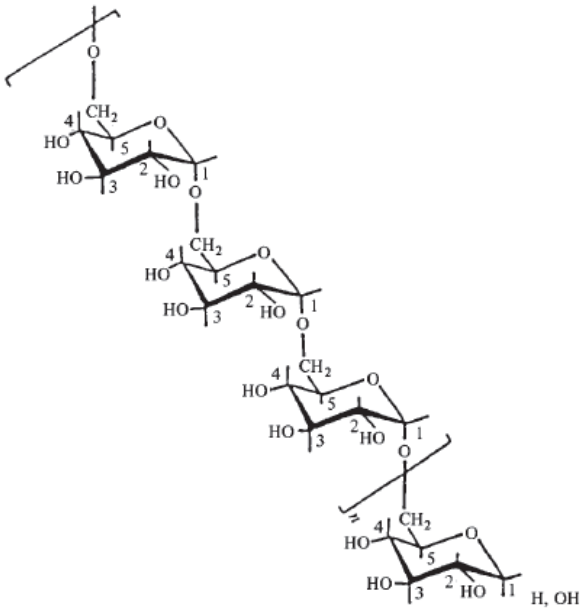
ในปัจจุบัน พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆอย่างหลากหลาย เช่น การแพทย์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการเคลือบ อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ อุตสาหกรรมการขุดเจาะน้ำมัน และการบำบัดน้ำเสีย (Freitas และคณะ, 2011) โดยเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น แซนแทน อะซีแตน เจลแลน และ เดกซ์แทน ซึ่งผลิตโดย *Xanthomonas campestris* *Acetobacter xylinum* *Sphingomonas paucimovilis* และ *Leuconostoc mesenteroides* ตามลำดับ เป็นต้น (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005)

ถึงแม้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีประโยชน์มากมาย สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างหลากหลาย แต่บางกรณีพอลิแซ็กคาไรด์นั้นก็ก่อข้อเสียได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ทำให้เกิดการเน่าเสียระหว่างการหมักไวน์ ทำให้เกิดสมบัติการไหลที่ไม่พึงประสงค์ (Lonvaud-Funel, 1999) ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนฟัน (Dental plaques) และเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้เกิดการก่อตัวของไบโอฟิล์มจึงทำให้เกิดความสกปรกกับเครื่องมือที่ใช้กระบวนการการผลิตผลิตภัณฑ์นม (Loesche, 1986; Rozen, 2001)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

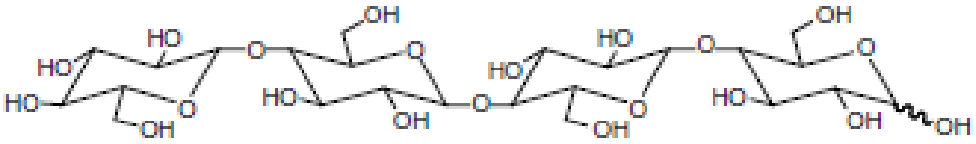
1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียว เช่น เดกซ์แทรน (dextran) เซลลูโลส (cellulose) ลีแวน (levan) มิวแทน (mutan) อัลเทอแนน (alternan) พูลลูแลน (pullulan) และ เคอร์ดแลน (curdlan) (Welman และ Maddox, 2003)

1.1 เดกซ์แทรน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสทั้งหมด เรียกว่า กลูแคน (glucan) เชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิก ส่วนใหญ่จะเป็นชนิด **α**-1,6 เป็นสายหลัก (รูปที่ 2.5) และมีกิ่งก้านหลายชนิด คือเชื่อมด้วยพันธะแบบ **α**-1,2 **α**-1,3 และ **α**-1,4 ในอุตสาหกรรมจะใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroid* NRRL B-512F ซึ่งจะผลิตเดกซ์แทรนชนิด **α**-1,6 ประมาณ 95% และ **α**-1,3 ประมาณ 5% น้ำหนักมวลโมกุลประมาณ 4-5 x 10^7 ดาลตัน (Sutherland, 1990; Monsan และคณะ, 2001)



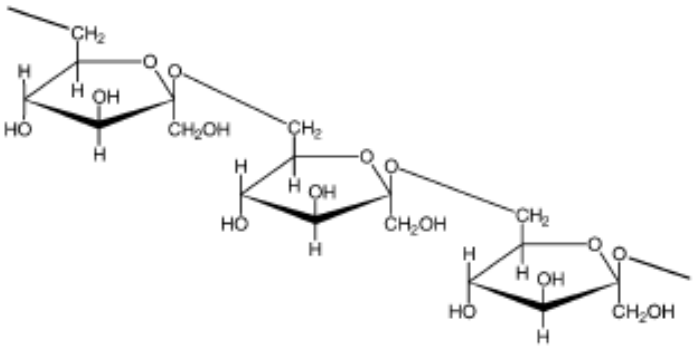
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (Sutherland, 1990)

1.2 เซลลูโลส (bacterial cellulose) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกันเป็นสายตรงด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-1, 4 (รูปที่ 2.6) เซลลูโลสนอกจากจะผลิตได้จากพืชแล้ว ยังสามารถผลิตจากจุลินทรีย์ *Acetobacter xylinum* (Herdman, 1993)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเซลลูโลส (Izydorczyk และคณะ, 2005)

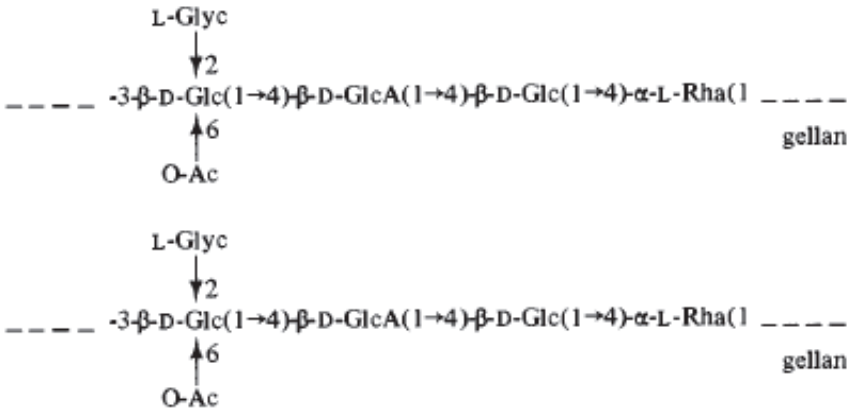
1.3 ลีแวน ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมกันเป็นสายยาว เรียกว่า ฟรุกแทน (fructan) โดยเชื่อมด้วยพันธะ ไกลโคซิดิกชนิด β-2,6 (รูปที่ 2.7) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus subtilis Zymomonas mobilis Streptococcus salivarius* และ *Streptococcus mutans* เป็นต้น (Monsan และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของลีแวน (Monsan และคณะ, 2001)

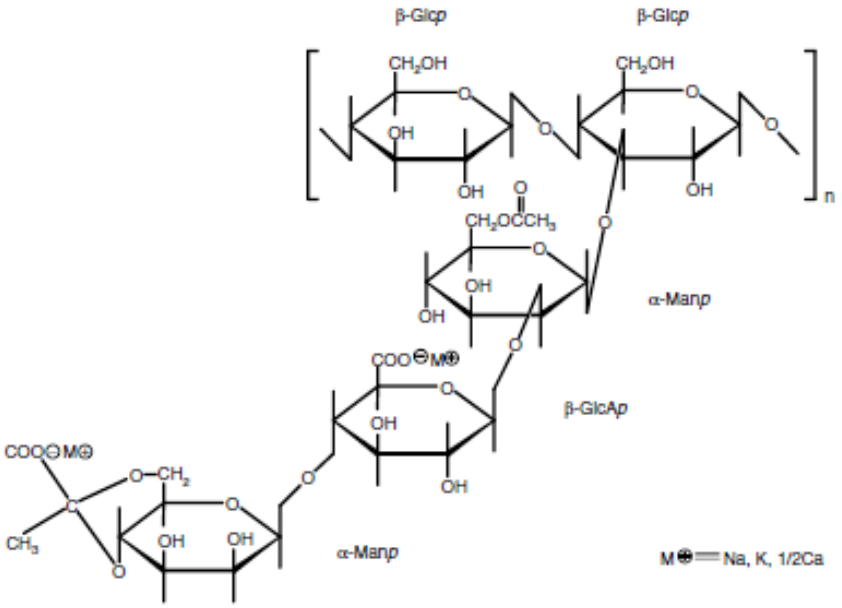
2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น เจลแลน และ แซนแทน (Laws และคณะ, 2001)

2.1 เจลแลน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Sphingmonas elodea* ประกอบด้วย เททระแซ็กคาไรด์ ซ้ำกันเป็นสายตรงยาว มีหมู่แทนที่ L-กลีเซอริล บนตำแหน่ง C ที่ 2 ของ 1, 3-กลูโคส และหมู่แทนที่กลุ่มอะซีติล อยู่บนตำแหน่ง C ที่ 6 ของ 1,3-กลูโคส เช่นกัน (รูปที่ 2.8) (Izydorczyk และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของเจลแลน (Sutherland, 1990)

2.2 แซนแทน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกสกุล *Xanthomonas* ส่วนแซนแทนทางการค้าผลิตจาก *Xanthomonas campestris* ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-1,4 ซึ่งเป็นสายหลัก มี ไตรแซ็กคาไรด์ (β-แมนโนส β - กลูโคโรนิกแอซิด และ α-แมนโนส) เป็นหมู่แทนที่ตรงตำแหน่ง C ที่ 3 (รูปที่ 2.9) (Morris, 2006)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของแซนแทน (Izydorczyk และคณะ, 2005)

สรุปตารางองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แสดงตัวอย่างในฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ และองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆที่ผลิตจากจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
แซนแทน	กลูโคส แมนโนส กลูคูโรนิกแอซิด อะซีเตท ไพรูเวท	*Xanthomonas* sp.
เจลแลน	กลูโคส แรมโนส กลูคูโรนิกแอซิด อะซีเตท กลีเซอเรท	*Sphingomonas* sp.
อัลจิเนต	กลูลูโรนิกแอซิด แมนนูโรนิกแอซิด อะซีเตท	*Azotobater* sp. และ *Pseudomonas* sp.
เซลลูโลส	กลูโคส	*Acetobacter xylinum*
เดกซ์แทรน	กลูโคส	*Leuconostoc mesenteroid*
เคอร์ดแลน	กลูโคส	*Agrobacterium* sp.
ไฮยาลูโรแนน	กลูคูโรนิกแอซิด อะซีติลกลูโคซามีน	*Pseudomonas aeruginosa*

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
ซัคซิโนไกลแคน	กลูโคส กาแลคโตส อะซีเตท ไพรูเวท ซัคซิเนต 3-ไฮดรอกซีไทเรท	สกุล *Rhizobium, Alcaligenes, Pseudomonas* และ *Agrobacterium*
ลีแวน	ฟรุกโทส	สกุล *Bacillus, Rahnella, Aerobacter, Erwinia, Streptococcus, Pseudomonas และ Zymomonas*

ที่มา : Freitas และคณะ (2011)

2.4 แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase negative) มีรูปร่างเป็นแท่งหรือกลม สร้างกรดแล็กติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ทั้งรูปแบบ D- หรือ L- แล็กติก และเป็นแบคทีเรียที่เจริญยาก (fastidious bacteria) (Axelsson, 2004) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างไซโตโครม และ พอร์ไฟริน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ดังนั้นจึงไม่สามารถสร้างพลังงาน ATP ได้จากศักย์ไฟฟ้าของโปรตอนที่ความเข้มข้นไม่เท่ากัน (proton gradient) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสร้าง ATP ได้จากการหมักเพียงเท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการหมักน้ำตาล ดังนั้นจึงไม่ใช้ออกซิเจนในการผลิตพลังงาน แล็กติกแอซิดแบคทีเรียชอบเจริญในภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ก็สามารถเจริญในภาวะที่มีอากาศได้ โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้ป้องกันผลิตภัณฑ์พลอยได้ของออกซิเจน (เช่น H_2O_2) โดยผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจัดว่าเป็น แบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน ซึ่งไม่มีความชอบออกซิเจนโดยเฉพาะ (aerotolerant anaerobes) สามารถแบ่งกลุ่มแล็กติกแอซิดตามการหมัก

น้ำตาลได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) กลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) จะผลิตกรดแล็กติกแอซิดเป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้น 2) กลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) ผลิตกรดแล็กติก เอทานอล อะซีเตท และคาร์บอนไดอกไซด์ (Khalid, 2011) ในการเจริญแล็กติกแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจนจึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน ไรโบฟลาวิน และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส (วราภรณ์ หิรัญวงษ์, 2550) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีสารอาหารมาก เช่น อาหารต่างๆ (นม เนื้อ ผัก) แต่บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในปาก ลำไส้ และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Whittenbury, 1964) อุณหภูมิ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง เรียกว่า mesophile เจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่าง 20 – 40 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญได้ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แล็กแอซิดแบคทีเรียสามารถทนกรดและเจริญที่ความเข้มของเกลือสูงได้ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีประมาณ 20 สกุล เช่น *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus,* และ *Weissella* เป็นต้น (Axelsson, 2004) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางโดยนำไปใช้ปรับปรุงความสามารถในการเก็บรักษา ลักษณะเชิงประสาทสัมผัส (sensorial characteristics) และ คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น นม เนื้อ และผัก (Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีความปลอดภัยในการบริโภคโดยได้รับรองว่าเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) (Mogensen และคณะ, 2002)

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ เช่น *Lactobacillus bulgaricus Lactococcus lactis* และ *Streptococcus thermophilus* ถูกคัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต (Kim และคณะ, 2008) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ที่รู้จักกันเป็นอย่างดีคือ *Leuconostoc mesenteroides* ผลิตเดกซ์แทรน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า (Monsan และคณะ, 2001) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น แป้งหมัก ไส้กรอก

ชีส โยเกิร์ต คีเฟอร์ ผลิตภัณฑ์นมต่างๆ และอาหารพื้นเมือง (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005; Mozzi และคณะ, 2006) หน้าที่ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตยังไม่มีการรายงานอย่างชัดเจน แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์ และการป้องกันเซลล์ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ Cerning (1990) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Streptococcus salivarius* และ *Streptococcus mutans* เกี่ยวข้องกับการรวมตัวของแบคทีเรีย (bacterial colonisation) และการก่อตัวคราบจุลินทรีย์บนฟัน (Dental plaques) Looijesteijn และคณะ (2001) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* NZ4010 สามารถป้องกันตัวเองจากสิ่งต่างๆ เช่น แบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) ไอออนของโลหะ (metal ions) ไนซิน (nisin) และไลโซไซม์ (lyzozyme)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลเพียงชนิดเดียว ส่วนใหญ่ได้แก่ กลูโคส เรียกว่า กลูแคน และฟรุกโทส เรียกว่า ฟรุกแทน ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย แบ่งออกเป็นได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ α-D-กลูแคน β-D-กลูแคน β-D-ฟรุกแทน และ พอลิกาแลกแทน (Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

EPS	สายพันธุ์	ลักษณะการเชื่อมของพันธะ
α-D-กลูแคน		
เดกซ์แทรน	*Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*	α -1,6-D-glc
	Leuconostoc mesenteroides subsp. *Dextranicum*	
มิวแทน	*Streptococcus mutans*	α -1,3-D-glc
	Streptococcus sobrinus	
อัลเทอแนน	*Leuconostoc mesenteroides*	α -1,3-D-glc/
		α -1,6-D-glc
β-D-กลูแคน	*Pediococcus* spp.	β -1,3-D-glc
	Streptococcus spp.	
β-D-ฟรุกแทน		
ลีแวน	*Streptococcus salivarius*	β -2,6-D-fru
อินนูลิน	*Streptococcus mutans*	β -2,1-D-fru
พอลิกาแลกแทน	*L. lactis* subsp. *lactis* H414	α -D-gal/
		β-D-gal

ที่มา : Ruas-Madiedo และคณะ (2002)

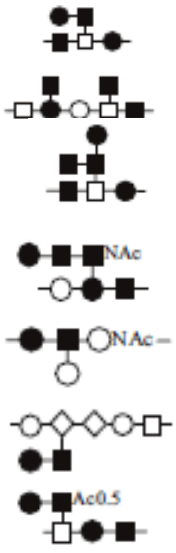
หมายเหตุ : glc แทน กลูโคส (glucose) fru = ฟรุกโทส (fructose)
และ gal = กาแลกโทส (galactose)

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิต α-กลูแคน เป็นส่วนมาก ได้แก่ สกุล *Leuconostoc Lactobacillus* และ *Weisella* (Korakli และ Vogel, 2006) ส่วน β-glucans พบแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผลิตได้น้อย เช่น *Lactobacillus diolivorans*, *Pediococcus damnosus, Pedicocccus parvulus* และ *Oenococcus oeni* (Walling และคณะ, 2005; Werning และคณะ , 2006) และ β-D-fructans ผลิตได้โดยสกุล *Streptococcus*, *Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Weissella* ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์โดยทั่วไปจะมีมอนอแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวเป็นสายหลัก แต่จะต่างกันตรงจำนวน ความยาวของกิ่งก้าน และลักษณะการเชื่อมของพันธะ ซึ่งขึ้นอยู่แต่

กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูงถึง 10^6 ดาลตัล (Monsan และคณะ, 2001; Korakli และ Vogel, 2006)

เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จะถูกสร้างเป็นหน่วยซ้ำๆ โดยส่วนมากจะประกอบด้วย D-กลูโคส D-กาแลกโทส และ L-แรมโนส พบส่วนน้อย เช่น N-อะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) N-อะซิติลกาแลกโตซามีน (GalNAc) หรือ กลูคูโรนิกแอซิด (GlcA) และบางครั้งก็พบหมู่แทนที่ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น ฟอสเฟต อะซีติล และกลีเซอรอล (Cerning, 1990) แสดงดังตารางที่ 2.6 น้ำหนักโมเลกุลของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์จะอยู่ในช่วงระหว่าง 4×10^4 ถึง 6×10^6 ดาลตัน (Ruas-Madiedo และคณะ, 2009)

ตารางที่ 2.6 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

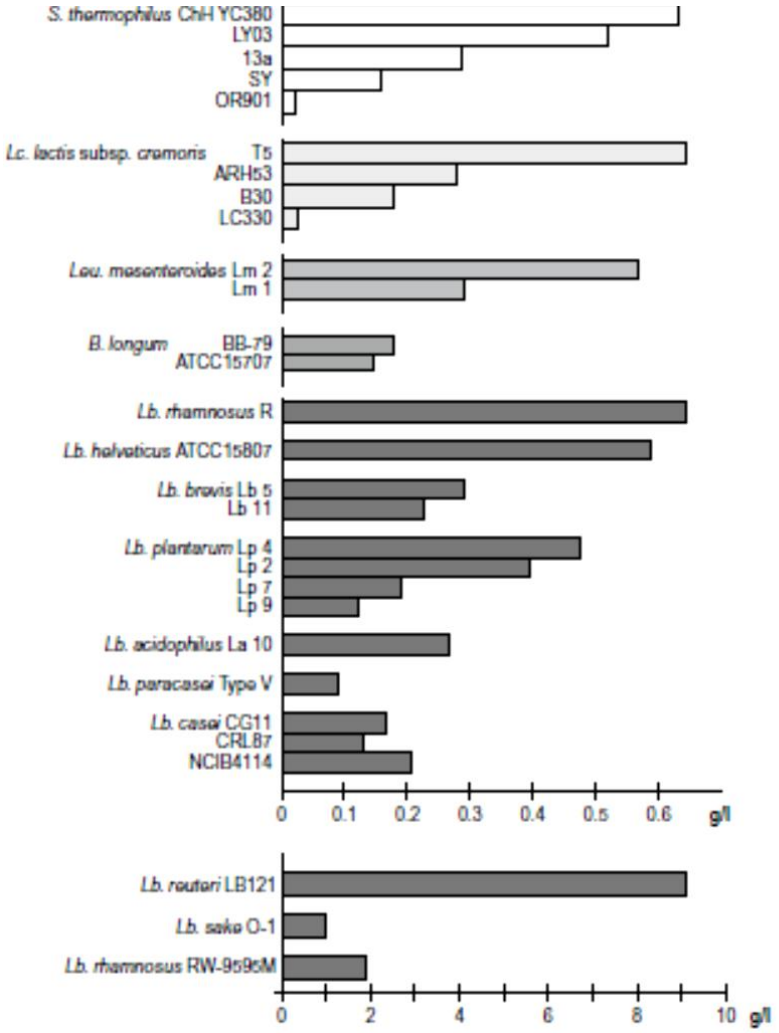
สายพันธุ์	หน่วยซ้ำ (repeating units)
Lactobacillus	
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaris 291*	
Lb. helveticus Lb161	
Lb. helveticus K16	
Streptococcus	
S. macedonius Sc136	
S. thermophilus SFi 20	
Lactococcus	
L. lactis subsp. *cremoris NIZO B39*	
L. lactis subsp. *cremoris NIZO B891*	

ที่มา : Ruas-Madiedo และคณะ (2002)

หมายเหตุ : (■) β-D-กลูโคส (●) β -D-กาแลกโทส (□) α-D-กลูโคส (○) α-D- กาแลกโทส (Nac) *N*-อะซิติล (Ac) อะซิติล

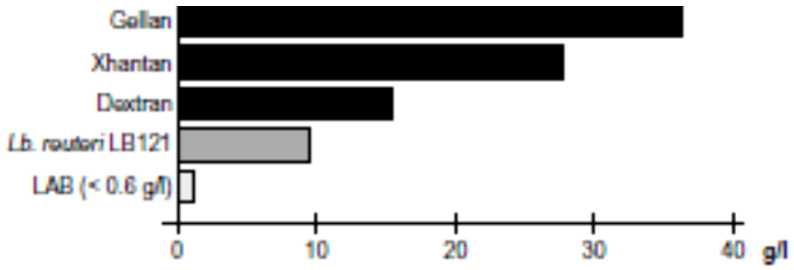
โดยทั่วไปปริมาณฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะมีปริมาณสูง เช่น *Lactobacillus reuteri* LB121 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงถึง 10 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 2.10) ส่วนเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะมีปริมาณน้อยอยู่ในช่วง 25 ถึง 600 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียก็ยังมี

ปริมาณต่ำ ถ้าเปรียบเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า เช่น เจลแลน แซนแทน หรือ เดกซ์แทรน (รูปที่ 2.11) (Sutherland, 1998)



รูปที่ 2.10 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

ที่มา : Ruas-Madiedo และคณะ (2009)



รูปที่ 2.11 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

ที่มา : Ruas-Madiedo และคณะ (2009)

ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์จะถูกสร้างนอกเซลล์โดยเอนไซม์ไกลแคนซูเครส (glycansucrases) ซึ่งใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้นจำเพาะ (specific substrate) สำหรับการเชื่อมต่อพันธะระหว่างไกลโคซิล (glycosyl) (กลูโคส หรือ ฟรุกโทส)(Monsan และคณะ, 2001) ไกลแคนซูเครส แบ่งออกเป็น กลูแคนซูเครส (glucansucrases) และ ฟรุกแทนซูเครส (fructansucrases) โดยกลูแคนซูเครสเป็นเอนไซม์สำหรับผลิต α-กลูแคน พบเฉพาะในแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ส่วนฟรุกแทนซูเครส พบทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ กลูแคนซูเครส และ ฟรุกแทนซูเครสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 แบบขึ้นอยู่กับโมเลกุลตัวรับ (acceptor molecule) ดังนี้

1. ซูโครส + น้ำ $\longrightarrow$ กลูโคส + ฟรุกโทส
2. ซูโครส + (กลูแคน หรือ ฟรุกแทน)$_n$ $\longrightarrow$ (กลูแคน)$_{n+1}$ + ฟรุกโทส หรือ (ฟรุกแทน)$_{n+1}$ + กลูโคส
3. ซูโครส + ตัวรับ (เช่น มอลโทส) $\longrightarrow$ ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ + กลูโคส กลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์+ ฟรุกโทส

ส่วน β-กลูแคน ถูกสร้างโดยเอนไซม์ไกลโคซิลทรานเฟอเรสที่เกาะติดกับเมมเบรน (membrane-bound glycosyltransferases) (Werning และคณะ, 2006)

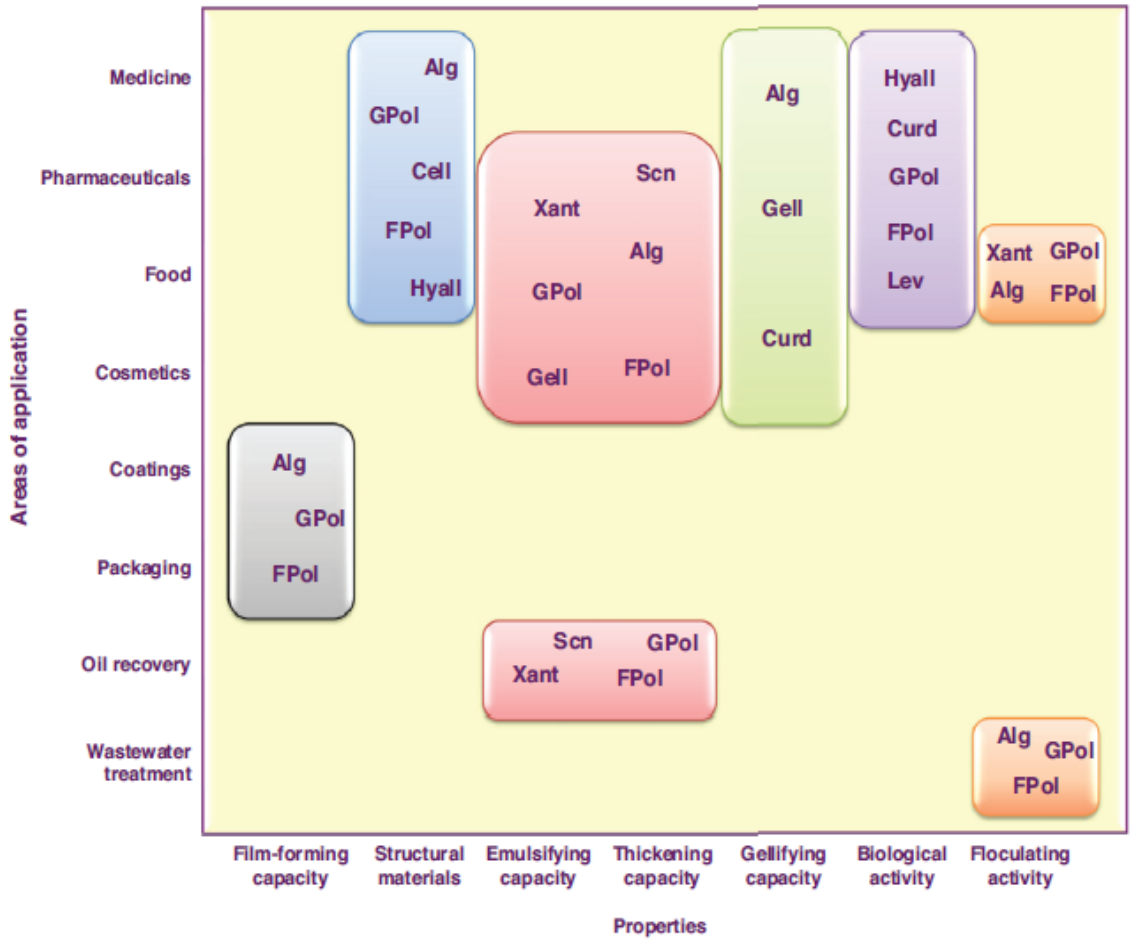
การผลิตเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์มีกระบวนการที่ซับซ้อน เพราะกระบวนการเกิดขึ้นทั้งในเซลล์ และ นอกเซลล์ และมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องหลายตัว (Boels และคณะ, 2001; Jolly และ Stingelle, 2001; Broadbent และคณะ, 2003) ยีนที่ควบคุมเป็นกลุ่มยีน (*eps* cluster) โดยกลุ่มยีนแบ่งเป็น 4 บริเวณ ประกอบด้วย ยีนควบคุม (regulatory genes) ยีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพอลิเมอร์และความยาวของสาย ยีนควบคุมเอนไซม์ไกลโคซิลทรานเฟอเรส และ ยีนเกี่ยวข้องกับการขนส่งและกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ (Jolly และ Stingelle, 2001; Broadbent และคณะ, 2003)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ได้ เพื่อปรับปรุงสมบัติการไหล (rheology) เนื้อสัมผัส (texture) และความรู้สึกในการบริโภค (mouthfeel) ของผลิตภัณฑ์หมัก เช่น นม โยเกิร์ต และชีส (Garai-Ibabe และคณะ, 2010) โดยจะนำไปใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด สารเพิ่มความคงตัว สารก่อเจล และสารก่ออิมัลชัน (Jolly และคณะ, 2002) นอกจากนี้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย มีความสามารถต่อต้านการเกิดเนื้องอก (antitumour) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory) (Welman และ Maddox, 2003) ต่อต้านการเกิดไบโอฟิล์ม (antibiofilm) (Kim และคณะ, 2009) และ ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Pan และ Mei, 2010)

2.5 ลักษณะสมบัติและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆของพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มีลักษณะสมบัติที่แตกต่างกัน โดยสมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ถูกนำไปพิจารณาเพื่อประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-binding capacity) ความสามารถในการก่อเจล (Gelation) ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying capacity) การเกิดความข้นหนืด (Thickening capacity) ความสามารถในก่อการจับกลุ่ม (Floculating activity) เป็นต้น (Venugopal, 2011; Freitas และคณะ, 2011) ด้วยความหลากหลายของสมบัติทางกายภาพจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมเคมี การแพทย์ และการบำบัดน้ำเสีย (Wang และคณะ, 2008) และสามารถนำไปใช้งานได้หลายรูปแบบ เช่น สารให้ความคงตัว สารก่อจับกลุ่ม สารก่ออิมัลชัน (emulsifiers) สารก่อเจล(gelling) สารเพิ่มความข้นหนืด สารดูดซับโลหะ (biosorbent) สารอุ้มน้ำ สารห่อหุ้ม (encapsulating materials) และสารก่อฟิล์ม (Gutnick และ Bach, 2000; Kachlany และคณะ, 2001; Jolly และคณะ, 2002)

การทราบสมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้เหมาะสม เช่น ความสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สามารถนำไปใช้ก่ออิมัลชันในน้ำสลัดหรือมายองเนส (Krog และ Sparso, 2007) ความสามารถในการอุ้มน้ำ นำไปใช้ในการลดการสูญเสียน้ำในผลิตภัณฑ์นม (Badel และคณะ, 2011) หรือ ป้องกันการแยกชั้นของคอนกรีต (Anonymous, 1996) ความสามารถในเพิ่มความข้นหนืด นำไปใช้ในอาหารและเครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ยา และ อุตสาหกรรมสีย้อม (De Vuyst และ Degeest, 1999) สมบัติการก่อฟิล์มนำไปใช้เป็นสารเคลือบอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Sutherland, 1990) ความสามารถในการก่อจับกลุ่ม นำไปใช้การบำบัดน้ำเสีย หรือ กระบวนการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ และอาหารหมักในช่วงกระบวนการปลายน้ำ (downstream processing) โดยช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์ในกระบวนการหมัก (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) ความสามารถให้ความคงตัวนำไปใช้กับไอศกรีมหรือน้ำสลัด ความสามารถในการก่อเจล นำไปใช้ในขนมหวานต่างๆ (Sutherland, 1990) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติเฉพาะตัวต่างๆ เช่น มีความเป็นพรีไบโอติกส์ ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารได้ สามารถต้านเนื้องอก กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ลดคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ (Ruas-Madiedo และคณะ, 2002; Ruas-Madiedo และคณะ, 2009) ในรูปที่ 2.12 ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพและการนำไปประยุกต์ใช้ต่างๆ



รูปที่ 2.12 ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพและการนำไปประยุกต์ใช้

หมายเหตุ : Alg (อัลจิเนต); Curd (เคอร์ดแลน); FPol (ฟูโคพอล); Gell (เจลแลน); GPol (กาแลกโตพอล); Hyall (ไฮยาลูโรแนน); Lev (ลีแวน); Scn (ซัคซิโนไกลแคน); Xant (แซนแทน)

ที่มา : Freitas และคณะ (2011)

ส่วนสมบัติทางเคมีมีผลต่อสมบัติทางกายภาพและการนำประยุกต์ใช้เช่นกัน เช่น ความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์จะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างและน้ำหนักมวลโมเลกุล หากน้ำหนักมวลโมเลกุลสูงจะส่งผลให้ความหนืดสูงตามไปด้วย ส่วนลักษณะโครงสร้างนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ และ ความเป็นกรดด่าง (Kanmani และคณะ, 2011) ถ้าอุณหภูมิสูง ทำให้แรงระหว่างโมเลกุลลดลง โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์จับกันอย่างหลวม จึงส่งผลให้ความหนืดลดลง (Freitas และคณะ, 2009) เมื่ออยู่ในภาวะเป็นกรด ความหนืดจะสูงมากกว่าในภาวะเบส

เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของประจุของโมเลกุล (Gauri และคณะ, 2009) องค์ประกอบของโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์อย่างเช่น หมู่ฟังก์ชันนอลมีผลต่อความสามารถในก่อการจับกลุ่ม (Floculating activity) คือ ถ้ามีหมู่ที่มีประจุลบมาก เช่น หมู่คาร์บอกซิล(COO^-) หมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) จะทำให้มีบริเวณจับกับประจุบวก (Ca^{2+}) ได้มาก (Ca^{2+} เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการจับกลุ่ม) ส่งผลเกิดการจับกลุ่มกับตะกอนได้ดีขึ้น (Bramhachari และคณะ, 2007; Zajic และ Knetting, 1970) สมบัติทางความร้อน ก็ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เช่นกัน โดยสมบัติทางความร้อน วิเคราะห์โดย TGA (thermogravimetric analysis) ทำให้ทราบความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์ อย่างเช่น แซนแทนกัม มีโครงสร้างประกอบด้วย 5 หน่วยย่อยซ้ำกัน มีน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และกรดกลูโคโรนิก มีอุณหภูมิย่อยสลาย (degradation temperature) ที่ 282.65 องศาเซลเซียส ส่วนโลคัส บีน (locust bean) มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง ประกอบด้วย น้ำตาลแมนโนสและ กาแลกโทส มีอุณหภูมิย่อยสลายที่ 278.46 องศาเซลเซียส (Wang และคณะ, 2008) พอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถทนต่อสลายที่อุณหภูมิสูงได้ดี ก็สามารถนำไปใช้กับอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงได้ สมบัติทางเคมีกายภาพ และการนำไปประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าดังตารางที่ 2.7 และการประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.7 สมบัติทางเคมีกายภาพ และการนำไปประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า

พอลิแซ็กคาไรด์	ประจุ	มวลโมเลกุล	ลักษณะสมบัติหลัก	การประยุกต์ใช้	ปริมาณในตลาด (เมตริกตัน)	มูลค่า (US$)	ราคา(US$) ต่อกิโลกรัม
แซนแทนกัม	ลบ	(2.0-50) x 10^6	- เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ - ความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ - ทนต่ออุณหภูมิ pH และความเข้มข้นเกลือในช่วงกว้าง	- อาหาร - ปิโตรเลียม - ยา - เครื่องสำอาง - การเกษตร	96,000	235 ล้าน	3-5
เจลแลน	ลบ	5.0 x 10^5	- เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ - ทนต่อpH ในช่วงกว้าง - ความสามารถในการก่อเจล - Thermoreversible gels	- อาหาร - อาหารสัตว์ - ยา - งานวิจัย (ใช้ใน gel electrophoresis)	N.A.	15 ล้าน	55-66
อัลจิเนต	ลบ	(0.3-1.3) x 10^6	- เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ - ความสามารถในการก่อเจล - ความสามารถในการก่อฟิล์ม	- อาหาร - การแพทย์ (ควบคุมการปล่อยสารในยา)	30,000	N.A.	5-20
เดกซ์แทรน	กลาง	10^6 – 10^9	- ไม่มีประจุ - มีความเสถียรดี - Newtonian fluid behavior	- อาหาร - ยา (เพิ่มปริมาณเลือด) -ตัวดูดซับโครมาโตกราฟี	2,000	N.A.	N.A.

ตารางที่ 2.7 สมบัติทางเคมีกายภาพ และการนำไปประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า (ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์	ประจุ	มวลโมเลกุล	สมบัติทางกายภาพ	การประยุกต์ใช้	ปริมาณในตลาด (เมตริกตัน)	มูลค่า (US$)	ราคา(US$) ต่อกิโลกรัม
เซลลูโลส	กลาง	10^6	- โครงสร้างเป็นผลึกสูง - ไม่ละลายในตัวทำละลาย - แรงต้านทานการดึงสูง	- อาหาร (เส้นใยที่ย่อยไม่ได้) - การแพทย์ (ใช้ในการรักษาแผล, เนื้อเยื่อหลอดเลือดเทียม)	N.A.	N.A.	5.8-12
เคอร์ดแลน	กลาง	$5x10^4$ - $2x10^6$	-สามารถก่อเจลได้ -ไม่ละลายน้ำ - มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	- อาหาร - ยา - กำจัดโลหะหนัก - ส่วนผสมของคอนกรีต	N.A.	N.A.	55
ซัคซิโนไกลแคน	ลบ	LMW <$5x10^3$ HMW >$1x10^6$	- สมบัติการไหลชนิด Pseudoplastic fluid - ทนต่อกรด	- อาหาร - อุตสาหกรรมน้ำมัน	N.A.	N.A.	N.A.
ลีแวน	ลบ	$3.0x10^6$	- ความหนืดต่ำ - มีฤทธิ์ทางชีวภาพ - ก่อฟิล์มได้	- อาหาร (พรีไบโอติกส์) - การแพทย์ - เครื่องสำอางค์	N.A.	N.A.	N.A.

หมายเหตุ : N.A คือ ไม่มีข้อมูล ที่มา: Freitas และคณะ (2011)

ตารางที่ 2.8 การประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม	คุณสมบัติ	พอลิแซ็กคาไรด์
สารยึดเกาะ - กาวลาเท็กซ์ - ปูนซีเมนต์ - กระดาษติดผนัง	ควบคุมการไหลและเพิ่มความข้นหนืด	เซลลูโลส เซลลูโลส อัลจิเนตและแป้ง
การเกษตร - ยาฆ่าแมลงชนิดผง - ปุ๋ยน้ำ - สารเติมแต่งในอาหารสัตว์	ควบคุมการลอยตัวของสารละลาย และเป็นส่วนประกอบ	แซนแทนกัม แซนแทนกัม แซนแทนกัมและกัวกัม
เซรามิก วัสดุทนความร้อน	ช่วยในการขึ้นรูปและเพิ่มความลื่น	อัลจิเนต
ลวดเชื่อม	สารแขวนลอย	แซนแทนกัม
ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดและขัด	นำมาใช้ขัด, สารแขวนลอย และ ทนต่อความเป็นกรดและด่าง	แซนแทนกัม
สารวัตถุระเบิด	ความสามารถในการอุ้มน้ำ	กัวกัมและแซนแทนกัม
สารดับเพลิง	ช่วยคงตัวของเนื้อโฟม และช่วยในการติดไฟ	กัวกัมและแซนแทนกัม
เหมืองแร่ (ใช้แยกวัสดุที่หนัก)	สารแขวนลอย	แซนแทนกัม แป้ง และกัวกัม
การขุดเจาะน้ำมัน - เพิ่มผลผลิตน้ำมันดิบ - โคลนเจาะ	ความหนืด ความหนืด สารแขวนลอย	แซนแทนกัม แซนแทนกัม และ เซลลูโลส
สี	ควบคุมการไหลของสาร	ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส และเมทิลเซลลูโลส
เจลดับกลิ่น	ช่วงคงตัวเจล	คาราจีแนน

ที่มา : Sandford และคณะ (1984)

2.6 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นจำนวนมาก โดยใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร (Wang และคณะ, 2008) พอลิแซ็กคาไรด์จะสามารถเปลี่ยนสมบัติการไหล (Rheological properties) ของน้ำที่อยู่ในอาหาร ทำให้เนื้อสัมผัสของอาหารนั้นเปลี่ยนไป เนื่องจากเกิดความข้นหนืด หรือ เกิดเจลขึ้น นอกจากนี้ทำให้เกิดความรู้สึกเมื่อบริโภคเข้าไป (mouthfeel) โดยเกี่ยวข้องกับความหนืดที่มีลักษณะการไหลเป็นแบบ non- Newtonian behavior พอลิแซ็กคาไรด์ที่ใส่ไปในอาหารมีความสามารถและสมบัติหลายอย่าง เช่น ควบคุมเนื้อสัมผัสของอาหาร และป้องกันและลดการเกิดผลึกน้ำแข็งในอาหารแช่แข็ง เป็นต้น (Sutherland, 2006) นอกจากนี้ยังมีสมบัติต่างๆของพอลิแซ็กคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอาหาร

ลักษณะสมบัติ	การประยุกต์ใช้
การยึดเกาะ	น้ำตาลโรยหน้าขนม (ไอซ์ซิ่ง) และ ผงเคลือบหน้าขนม (glaze)
สารจับเกาะ	อาหารสัตว์
สารเคลือบ	ลูกกวาด
สารก่ออิมัลชัน	น้ำสลัด
การห่อหุ้ม	ผงปรุงกลิ่น
การก่อฟิล์ม	เคลือบผิวบนไส้กรอก
สารช่วยตกตะกอน	ไวน์และเบียร์
สารช่วยคงตัวโฟม	เบียร์
สารก่อเจล	ลูกกวาด ขนมหวานที่มีส่วนผสมของนม เยลลี่ และพาย
สารยับยั้งการเกิดผลึก	อาหารแช่แข็ง ยาเม็ดอม และน้ำเชื่อม
สารเพิ่มความคงตัว	ไอศกรีม และน้ำสลัด
สารก่อความบวม	ผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านกระบวนการ
สารลดการสูญเสียน้ำ	ชีส และอาหารแช่แข็ง
สารเพิ่มความหนืด	แยม ซอส น้ำเชื่อม และ ไส้พาย

ที่มา : Sutherland (1990)

การนำพอลิแซ็กคาไรด์มาใช้กับอาหาร อาจมีผลต่อลักษณะอาหารบางอย่าง เช่น สี รส และกลิ่น ดังนั้นจึงควรพิจารณาในการเลือกใช้พอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีปัจจัยในการเลือกใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอาหาร ดังนี้ (Sutherland, 1990)

1. ประเภทของการนำไปประยุกต์ใช้
2. ลักษณะข้นหนืด หรือ ก่อเจล
3. ความรู้สึกในการบริโภค (mouthfeel)
4. ผลต่อลักษณะปรากฏของอาหาร เช่น ความใส
5. ความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์
6. สามารถเข้าได้กับส่วนผสมอื่นๆในอาหาร
7. ผลกระทบแบบเสริม หรือผลกระทบอื่นๆ
8. ความทนต่อปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพภายใต้ภาวะที่นำไปใช้
9. ราคา
10. การยอมรับ เช่น กฎหมายในการบริโภค
11. คุณภาพ เช่น คำนึงถึงสี รส และคุณภาพสม่ำเสมอหรือไม่

พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่นำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร ที่พบมากที่สุด คือ แซนแทนกัม และ เจลแลน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า (Farnworth และคณะ, 2006) และยังมีเคอร์ดแลน และ พูลลูแลน ที่ประยุกต์ใช้ในอาหารเช่นกัน โดยพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารด้วยลักษณะที่แตกต่างกัน หรือพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดอย่างเช่น แซนแทนกัม มีสมบัติที่หลากหลาย จึงนำไปใช้ประยุกต์ได้หลายรูปแบบ แสดงดังตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่ประยุกต์ใช้ในอาหาร

EPS	ลักษณะสมบัติ						
	ก่อเจล	เพิ่มความหนืด	การกระจาย	ก่ออิมัลชัน	จับเกาะ	อุ้มน้ำ	ก่อฟิล์ม
แซนแทน	○[1]	⊙	⊙	⊙	○	○	
เจลแลน	⊙		⊙				○
เคอร์ดแลน	⊙					○	○
พูลลูแลน					⊙		⊙

หมายเหตุ: ⊙ ใช้บ่อยมากในอุตสาหกรรมอาหาร ○ใช้บ่อยในอุตสาหกรรมอาหาร

[1] ไม่สามารถก่อเจลได้เอง ต้องร่วมกับสารอื่น

ที่มา : Funami (2009)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย มีประโยชน์ในอาหารหมักต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม (โยเกิร์ต และชีส) ผัก (กระหล่ำดอง) เนื้อ (ไส้กรอก) ผลไม้ (ไวน์) และ ธัญพืช (ขนมปัง และเบียร์) โดยประโยชน์จากพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียพบว่ายังมีน้อย (Farnworth และคณะ, 2006) อาหารหมักต่างๆเหล่านี้มักพบแล็กติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งมีหน้าที่ในการหมักอยู่แล้ว โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และปล่อยออกมาสู่ภายนอก จึงส่งผลให้แก่อาหารนั้นๆ เช่น เพิ่มความหนืด ปรับปรุงเนื้อสัมผัสและทำให้เกิดความรู้สึกในการบริโภค เป็นต้น ในโยเกิร์ต พอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มความหนืดในโยเกิร์ตชนิดคน (stirred yoghurt) ปรับปรุงเนื้อสัมผัส และลดการสูญเสียของน้ำในโยเกิร์ตชนิดแข็งตัว (set yoghurt) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม (Ruas-Madiedo และคณะ, 2009) แสดงดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม

สกุล	สายพันธุ์	ผลิตภัณฑ์นม
Lactococcus	*Lc. lactis* subsp. *cremoris*	นมหมัก และชีส
Lactobacillus	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *Lb. acidophilus* *Lb. kefiranofaciens*	โยเกิร์ต และนมหมัก นมหมัก คีเฟอร์
Leuconstoc	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*	คีเฟอร์
Streptococcus	*S. macedonicus* *S. thermophilus*	ชีส โยเกิร์ต และมอซซาเรลล่าชีส
Bifidobacterium	*B. animalis* subsp. *lactis* *B. longum*	นมหมัก นมหมัก
Propionibacterium	*Pr. freudenreichii* subsp. *shermanii*	สวิตส์ชีส

ที่มา: Ruas-Madiedo และคณะ (2009)

2.7 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

2.5.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromato graphy)

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี หรือ HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกสารประกอบที่อยู่ในตัวอย่าง ส่วนใหญ่จะใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก หรือ มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง HPLC จะประกอบด้วยสองเฟส ได้แก่ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ความดันสูง เพื่อดันสารละลายให้เคลื่อนที่ผ่านตามคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป การแยกสารประกอบอาศัยหลักการความแตกต่างการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความสามารถในการดูดซับของสารประกอบกับเฟสอยู่กับที่ สารประกอบที่มีการดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะเคลื่อนที่ได้ช้า จึงถูกแยกออกมาทีหลัง ส่วนสารประกอบที่มีการดูดซับกับเฟสอยู่กับที่ได้ต่ำ ก็จะเคลื่อนที่ผ่าน

คอลัมน์ได้รวดเร็ว จึงแยกออกมาได้เร็ว สารที่แยกออกมาจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัววัดสัญญาน สัญญาณที่ตรวจวัดได้จะถูกบันทึกและแสดงออกมาเป็นพีก เรียกว่า โครมาโทแกรม (Lindsay, 1991)

HPLC สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) โดยเปรียบเทียบ Retention time (RT) กับสารมาตรฐาน เพื่อทราบว่าเป็นสารชนิดใด และเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) โดยวัดความสูงของพีกกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว หรือ วัดพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบชีวภาพ พอลิเมอร์ และไอออนขนาดเล็ก เป็นต้น เทคนิค HPLC ถูกนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา อาหาร ปิโตรเคมี และสิ่งแวดล้อม (Skoog และคณะ, 2007)

2.5.2 เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis: TGA)

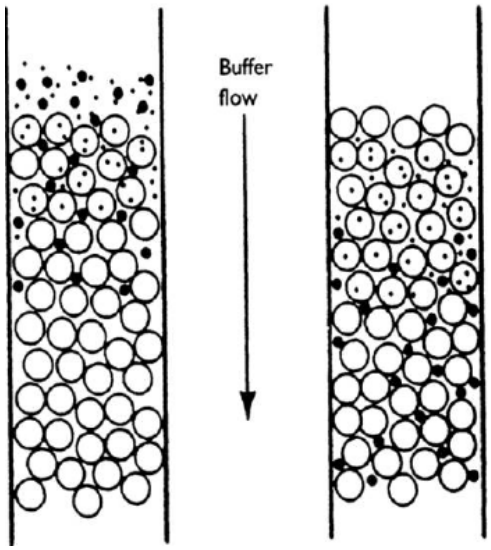
เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของวัตถุ โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของวัตถุ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ ภายใต้บรรยากาศที่กำหนด สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลายชนิด เช่น พอลิเมอร์ สารอินทรีย์ ยา เครื่องสำอาง สี และสารประกอบในอาหาร เป็นต้น ผลการวิเคราะห์ทดสอบสามารถทำให้ทราบความเสถียรทางความร้อนของสาร ความร้อนที่วัตถุดูดหรือคาย น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงและน้ำหนักที่หายของสารไปเมื่อได้รับความร้อน และปริมาณความชื้นหรือสารระเหยของวัตถุ เป็นต้น (Galwey และ Craig, 2006)

TGA ประกอบด้วย สองส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ตัววัดสัญญานน้ำหนัก (mass detector) และ ตัววัดสัญญาณความร้อน (temperature detector) ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักจะขึ้นกับอุณหภูมิ เวลา และบรรยากาศ โดยการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักวัดด้วยเครื่องชั่งที่มีความละเอียดและความไวสูง (thermobalance) ข้อมูลจะถูกตรวจวัดและบันทึกออกมาเป็น โครมาโทแกรม ระหว่างน้ำหนักกับเวลา หรือ น้ำหนักที่หายไปกับเวลา (Gilman, 2006)

2.5.3 เจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี (Gel filtration chromatography)

เจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) หรือ Size exclusion chromatography เป็นเทคนิคการวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยอาศัยหลักการ

ความแตกต่างน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ในสารละลาย การแยกขนาดของพอลิเมอร์จะใช้เม็ดเจลที่มีรูพรุนเป็นอนุภาคอยู่ในคอลัมน์ โดยรูพรุนในเนื้อเจลเกิดจากการเชื่อมไขว้ (cross-link) ของพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบ เมื่อฉีดสารละลายพอลิเมอร์เข้าไปในคอลัมน์ พบว่าขนาดพอลิเมอร์ต่างกันก็จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ต่างกัน โดยพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถเข้าไปแทรกในรูพรุนของเม็ดเจลได้ ก็จะเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วมากับสารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนพอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็ก สามารถเข้าไปแทรกในรูพรุนของเม็ดเจลได้ จึงทำให้เคลื่อนที่ออกมาช้ากว่า (รูปที่ 2.13) สารละลายพอลิเมอร์ที่เคลื่อนออกมาในช่วงเวลาต่างๆ ก็จะมีขนาดโมเลกุลที่ไม่เท่ากัน ตัววัดสัญญาณ (Detector) เช่น UV detector หรือ Reflective Index detector (RI) จะวัดปริมาณสารละลาย พอลิเมอร์ที่เคลื่อนที่ออกมาในช่วงเวลาต่างๆ และสามารถแสดงออกมาเป็นโครมาโทแกรม ระหว่างปริมาณสารกับเวลาที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (retention time) (Skoog และคณะ, 2007)

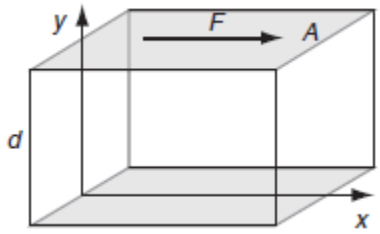


รูปที่ 2.13 หลักการเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี
ที่มา: Eriksson (2002)

2.8 **สมบัติการไหล** (Rheological properties)

ความหนืด (Viscosity) คือ ความสามารถในการต้านการไหลของของไหล เมื่อมีแรงมากระทำ ส่วนของไหล หมายถึง สสารที่สามารถไหลได้ เช่น ของเหลว และแก๊ส ของไหลที่มีความหนืดสูง จะมีการต้านทานต่อการไหลสูง ขณะที่ของไหลที่มีความหนืดต่ำ ก็จะมีการต้านทานต่อการไหลต่ำ การวัดความหนืด จะเป็นการวัดแรงต้านทานการไหลภายในของของไหล เมื่อมีแรงมากระทำ ในแนวขนานกับพื้นผิว เรียกว่า แรงเฉือน (Shear force) เมื่อพิจารณาก้อนของไหล

สี่เหลี่ยมที่ประกอบด้วยแผ่นโมเลกุลหลายแผ่นขนานกันอยู่ ดังรูปที่ 2.14 โดยแผ่นล่างสุดถูกยึดไว้อยู่ เมื่อแผ่นบนได้รับแรงกระทำคงที่ แผ่นด้านล่างถัดไปจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางจากแผ่นล่างสุดที่ไม่เคลื่อนที่ ความแตกต่างของความเร็ว (dv) ระหว่างของไหลสองแผ่นกับระยะทางที่เปลี่ยนไป (dx) คือ อัตราเฉือน (Shear rate) ส่วนค่าแรงต่อหน่วยพื้นที่ที่ทำให้เกิดการไหล เรียกว่า แรงเค้นเฉือน (Shear stress) (Grassi และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.14 แบบจำลองก้อนของไหลเมื่อได้รับแรงกระทำ
ที่มา: Grassi และคณะ (2006)

ลักษณะพฤติกรรมการไหล แบ่งออกได้เป็นสองประเภท ได้แก่

1. Newtonian fluid เป็นพฤติกรรมการไหลของของไหลที่เป็นไปตามสัณนิษฐานของนิวตัน คือ ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ ค่าความหนืดคงที่ ไม่ขึ้นกับอัตราเฉือน หรือ ความเร็วในการกวน ตัวอย่างเช่น น้ำ น้ำเชื่อม น้ำมัน น้ำผลไม้ นม กาแฟ แอลกอฮอลล์ เป็นต้น (Tracton, 2006)

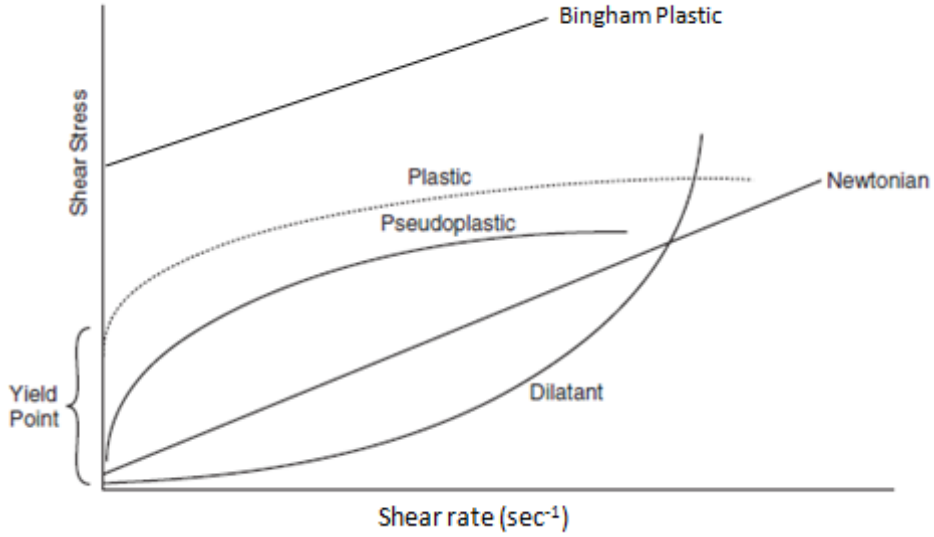
2. Non Newtonian fluid เป็นพฤติกรรมการไหลของของไหลที่ไม่เป็นไปตามสัณนิฐานของนิวตัน คือ ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ ค่าความหนืดไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับอัตราเฉือนหรือ ความเร็วในการกวน (Farid, 2010) แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด (รูปที่ 2.15) ได้แก่

2.1 Pseudoplastic ของไหลที่มีความหนืดลดลง เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น หรือความเร็วการกวนมาก ยิ่งกวน ยิ่งไหลง่ายขึ้น พฤติกรรมนี้แสดงสมบัติที่เรียกว่า “shear thinning” ตัวอย่างเช่น สารละลายพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ สารละลายพอลิเมอร์สังเคราะห์ น้ำผลไม้เข้มข้น และ สารช่วยแขวนตะกอน เป็นต้น

2.2 Dilatant ของไหลที่มีความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น หรือ ความเร็วในการกวนมาก ยิ่งกวน ยิ่งมีความหนืดมากขึ้น พฤติกรรมนี้แสดงสมบัติที่เรียกว่า “shear thickening” ตัวอย่างเช่น น้ำแป้ง และ น้ำดินข้น เป็นต้น

2.3 Bingham plastic ของไหลที่เมื่อมีแรงมากระทำสูงพอ จึงจะเกิดลักษณะการไหลแบบ Newtonian fluid ตัวอย่างเช่น นมช็อกโกแลต ยาสีฟัน และน้ำสลิปของเซรามิก เป็นต้น

2.4 Plastic ของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอเพื่อเอาชนะค่าความเค้น ณ จุดคราก (yield stress) ถึงจะเริ่มไหลได้ และจะไหลแบบ Pseudoplastic หรือ ตามโมเดลของ Herschel-Buckley ตัวอย่างเช่น ซอสมะเขือเทศ สี ดินเหนียว มายองเนส ยาน้ำแขวนตะกอน เป็นต้น (Farid, 2010)



รูปที่ 2.15 ลักษณะการไหลของของเหลว
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Tracton (2006)

2.9 **อิมัลชัน** (Emulsion)

อิมัลชัน คือ ของเหลวตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปที่สามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่แยกชั้น ในขณะที่ปกติแล้วจะไม่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ เช่น น้ำ กับ น้ำมัน โดยจะประกอบด้วย 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคภายใน (dispersed, discontinuous หรือ internal phase) ได้แก่ หยดเล็กๆ (droplet) ที่กระจายตัวอยู่ในของเหลวที่เรียกว่า วัฏภาคภายนอก (continuous หรือ external phase) การเกิดอิมัลชันสามารถเกิดได้ในอาหาร (นม มายองเนส) เครื่องสำอางค์ (ครีม โลชัน) ยา (วิตามินละลายน้ำ ฮอร์โมน) และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (ยาฆ่าศัตรูพืชและวัชพืช) (Schramm และ Stasiuk, 2005)

อาหารที่ต้องอาศัยการเกิดอิมัลชันนั้น เรียกว่า อาหารอิมัลชัน (Food emulsion) เป็นระบบที่ซับซ้อนมาก ประกอบด้วยอากาศ น้ำมัน น้ำ และส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน โปรตีน เกลือที่ละลายน้ำ คาร์โบไฮเดรต พอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำ เส้นใย และเม็ดแป้ง เป็นต้น (Garti, 2000) ตัวอย่างอาหารอิมัลชัน เช่น นม ครีม น้ำผลไม้ น้ำสลัด มายองเนส ซอส ไอศกรีม เนย และเนยเทียม

น้ำสลัดเป็นหนึ่งในอาหารชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) ไว้ใช้ปรุงแต่งรสชาติในสลัดหรืออาหารชนิดๆที่ต้องการ โดยทั่วไปน้ำสลัดที่ขายตามท้องตลาดจะเป็นแบบสำเร็จรูป ใช้บริโภคได้ทันที หรือ ผสมให้เข้ากันก่อนบริโภคโดยแยกชั้นน้ำมันและน้ำไว้

น้ำสลัด สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามองค์ประกอบและลักษณะข้นหนืด ดังนี้

1. Spoonable เป็นน้ำสลัดที่มีความข้นหนืดมาก เวลาออกจากภาชนะต้องใช้ช้อนตัก มีปริมาณไขมันสูง
2. Pourable เป็นน้ำสลัดที่สามารถเทออกจากขวดหรือภาชนะได้ง่าย มีปริมาณไขมันต่ำ (McClements, 2004)

สารอิมัลซิไฟเออร์และสารให้ความคงตัวอิมัลชันที่ใช้ในน้ำสลัด มีหลายชนิด เช่น โปรตีน (ไข่ทั้งฟอง ไข่ขาว ไข่แดง บัตเตอร์มิลค์ สกิมมิลค์) ฟอสฟอลิปิด (ไข่แดง ไข่ทั้งใบ ซาวครีม) สารสังเคราะห์ (พอลิซอร์เบต) สารเคมีดัดแปร (โพรพิลีนไกลคอลอัลจิเนต) และพอลิแซ็กคาไรด์ (แซนแทนกัม โซเดียมอัลจิเนต โลคัสบีนกัม กัวกัม กัมอะราบิก กัมอะคาเซีย แป้ง แป้งดัดแปร และไมโครคริสตัลลีน เซลลูโลส) (Ford และคณะ, 2003)

นอกจากนี้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) ประกาศโดย สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ว่าด้วยเรื่อง มายองเนสและน้ำสลัด (มอก.1402-2540) อนุญาตให้ใช้สารคงตัวดังตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 สารคงตัวในมายองเนสและสลัดครีมที่อนุญาตใช้โดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.)

สารต่อไปนี้ ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือผสมกันในปริมาณที่เหมาะสม	**แป้งดัดแปรต่อไปนี้ ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือผสมกันในปริมาณที่เหมาะสม**
1.คาราจีแนน 2.โซเดียมอัลจิเนต หรือโพแทสเซียมอัลจิเนต หรือโพรพิลีนไกลคอลอัลจิเนต 3.คารอบกัม หรือกัวกัม หรือแซนแทนกัม 4.โซเดียมคาร์บอกซีเมทีลเซลลูโลส 5.ทรากะแคนต์ 6.เพกทิน 7.กัมอะคาเซีย	1.แอซีทิเลเตดไดสตาร์ชอะดิเพต 2.แอซีทิเลเตดไดสาร์ชฟอสเฟต 3.ไดสตาร์ชฟอสเฟต 4.ไฮดรอกซี-โพรพิลฟอสเฟต

ที่มา : มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2540): ออนไลน์

อิมัลชันที่เกิดในอาหาร จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำมันหรือน้ำอยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 100 ไมโครเมตร (Friberg และ Larrson, 1997) และสามารถแบ่งการเกิดอิมัลชันออกได้เป็น 3 ประเภท ตามลักษณะวัฏภาคภายใน และวัฏภาคภายนอก ดังนี้

1. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water หรือ O/W emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีหยดน้ำมันเป็นวัฏภาคในกระจายอยู่ในน้ำที่เป็นวัฏภาคภายนอก ตัวอย่างเช่น นม ครีม น้ำสลัด มายองเนส เครื่องดื่ม และซอส
2. อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil หรือ W/O emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีหยดน้ำเป็นวัฏภาคในกระจายอยู่ในน้ำมันที่เป็นวัฏภาคภายนอก ตัวอย่างเช่น เนย (butter) และ เนยเทียม (magarine)
3. อิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ เกิดได้หลายรูปแบบ เช่น อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (O/W/O) หรือ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (W/O/W) ถ้าเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (O/W/O) ก็คือ จะมีน้ำมันเป็นวัฏภาคภายนอก โดยมีน้ำเป็นวัฏภาคภายใน ซึ่งในหยดน้ำก็จะมีหยดน้ำมันซ้อนอยู่อีกที (Garti, 1997; Garti และ Bisperink, 1998; Garti และ Benichou, 2004)

การทำให้เกิดอิมัลชัน คือ การผสมให้เป็นเนื้อเดียว (homogenization) ทำให้น้ำกับน้ำมันเข้าเป็นเนื้อเดียว โดยอาจใช้วิธีการคน และเขย่า ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้เครื่องผสม เช่น เครื่อง homogenizer และ blender เป็นต้น การทำให้เกิดอิมัลชันด้วยวิธีผสมให้เข้ากัน จะทำให้เกิดอิมัลชันได้ไม่นาน จะเกิดการแยกชั้นได้รวดเร็ว การทำให้อิมัลชันสามารถคงตัวอยู่ได้นาน คือ การใส่ สารให้ความคงตัว (stabilizer) (McClements, 2004)

สารให้ความคงตัวที่ทำให้อิมัลชันคงตัวอยู่ได้นาน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามกลไกการทำงาน (mode of action) ดังนี้

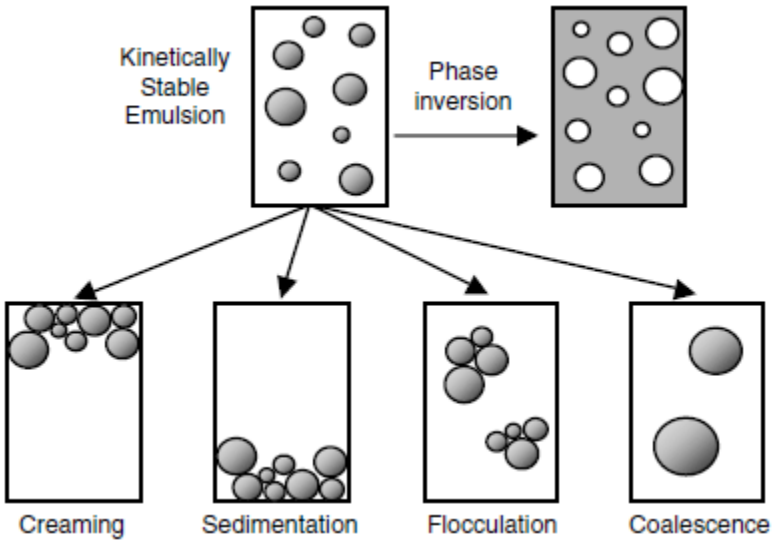
1. สารอิมัลซิไฟเออร์ เป็นสารจำพวก surface-active molecule จะดูดซับอยู่บนหยดน้ำมัน ระหว่างการผสม เสมือนเป็นเกราะป้องกันไม่ให้หยดเล็กๆเคลื่อนที่มารวมตัวกันจนกลายเป็นหยดใหญ่ได้ สารอิมัลซิไฟเออร์ส่วนใหญ่จะเป็น แอมฟิฟิลิก (amphiphilic molecule) คือ ในโมเลกุลเดียวกันจะมีทั้งส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว โดยสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้อุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวโมเลกุลขนาดเล็ก (small-molecule surfactant) ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดมีโครงสร้างตรงสายหลักเป็นส่วนมีขั้ว และเส้นกิ่งเป็นส่วนไม่มีขั้ว (Dickinson, 2003)
2. สารดัดแปลงเนื้อสัมผัส (texture modifiers) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามกลไกการปฏิบัติงาน (mode of operation) และลักษณะของของไหล

   2.1 สารข้นหนืด (thickening agents) ใช้เพิ่มความหนืดของวัฏภาคภายนอก

   2.2 สารก่อเจล (gelling agents) ใช้ก่อเจลในวัฏภาคภายนอก

   สารดัดแปลงเนื้อสัมผัสจะช่วยทำให้อิมัลชันคงตัวอยู่ได้นาน โดยการลดการเคลื่อนที่ของวัฏภาคภายใน หรือ หยดเล็กๆไม่ให้มารวมตัวกันได้ เนื่องจากของเหลวที่อยู่รอบๆมีความหนืด หรือมีเจลเกิดขึ้น จึงทำให้ยากแก่การเคลื่อนที่ของวัฏภาคภายใน ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้สารข้นหนืด และสารก่อเจล เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีนในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และ ผลึกไขมันในอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (McClements, 2004)

การคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability) คือ ความสามารถของอิมัลชันที่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่อเวลา กลไกทางเคมีกายภาพ (physicochemical mechanisms) ทำให้ลักษณะอิมัลชันเปลี่ยนไปได้หลายแบบ ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 2.16)



รูปที่ 2.16 กลไกความไม่คงตัวของอิมัลชัน (Mechanisms of emulsion instability)
ที่มา: McClements, (2004)

1. Creaming หยดเล็กๆ (วัฏภาคภายใน) เคลื่อนที่ขึ้นข้างบน เนื่องจากความหนาแน่นน้อยกว่าของเหลวรอบๆ (วัฏภาคภายนอก)
2. Sedimentation หยดเล็กๆ (วัฏภาคภายใน)เคลื่อนที่ลงข้างล่าง เนื่องจากความหนาแน่นมากกว่าของเหลวรอบๆ (วัฏภาคภายนอก)
3. Flocculation เกิดจาก droplet มากกว่า 2 อัน เคลื่อนที่มารวมกันแต่ยังคงสภาพเป็นหยดอยู่
4. Coalescence เกิดจาก droplet มากกว่า 2 อัน เคลื่อนที่มารวมกัน เกิดเป็นหยดขนาดใหญ่ กลไกนี้หากนานขึ้น จะเกิดการแยกชั้นของน้ำมันที่ด้านบน เรียกว่า oiling-off
5. Phase inversion วัฏภาคสลับกัน อย่างเช่น จากอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ กลายเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Schramm และ Stasiuk, 2005; Burgess และ Chidambaram, 2005)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
3. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -80 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องระเหิดแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
8. โถดูดความชื้น
9. เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
10. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
11. ไมโครปิเปต รุ่น P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
12. หลอดทดลอง ของบริษัท PYREX
13. จานเลี้ยงเชื้อ ของบริษัท PYREX
14. กระบอกเซนตริฟิวส์ ของบริษัท NALGENE, USA
15. ขวดรูปชมพู่ ของบริษัท PYREX

16. หลอดทดลองฝาเกลียว ของบริษัท PYREX
17. ตู้แช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของบริษัท Sanyo, Japan
18. ตู้อบความร้อนแห้ง รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
19. Arm flask ของบริษัท PYREX
20. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 ของบริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong
21. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
22. กระดาษวัดความเป็นกรด-เบส ของบริษัท Merck, Germany
23. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น 2000ES ขอบบริษัท Alltech, USA
24. คอลัมน์ Sugar SZ5532 ของบริษัท Shodex, Japan
25. เครื่อง Evaporative Light Scattering Detectors บริษัท Alltech, USA
26. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
27. กระดาษกรอง Whatman ของบริษัท General Electric (GE)
28. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น Spectrafuge ของบริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
29. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น Mikro20 ของบริษัท Hettich zentrifugen, Germany
30. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
31. เครื่อง Perkin-Elmer TGA 7 thermogravimetric analyzer
32. คิวเวตต์ ของบริษัท PYREX
33. เครื่อง Gel permeation chromatography
34. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
35. เครื่องปั่นอาหาร ของบริษัท Philips
36. พาราฟิล์ม ของบริษัท American national can
37. หลอดทดลองทรงกระบอก ของบริษัท PYREX
38. ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท EXELO

39. ปิเปตทิป ขนาด 1-200 ไมโครลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml ของบริษัท Axygen Scientific, USA
40. กระบอกตวง ของบริษัท PYREX
41. บีกเกอร์ ของบริษัท PYREX
42. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
43. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BX51 พร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูป รุ่น DP71 บริษัท Olympus, Japan
44. ปิเปตต์แก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท HBG, Germany
45. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Lactobacilli MRS broth สำเร็จรูป บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA
2. โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA
3. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
4. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Biospringer, France
5. ซูโครส (น้ำตาลทรายขาว) บริษัท น้ำตาลมิตรผล ประเทศไทย
6. ทวีน 80 บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมอะซิเตต บริษัท Merck, Germany
8. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต บริษัท Carlo Erba, Italy
9. แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, German
10. แมงกานีสซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
11. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
12. โบรโมครีซอล เพอร์เพิล บริษัท Fluka, USA
13. กลีเซอรอล บริษัท Merck, Germany
14. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
16. กรดไตรคลอโรอะซิติก บริษัท Merck, Germany
17. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
18. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany

19. ฟีนอล บริษัท Merck, Germany
20. กลูโคส บริษัท Merck, Germany
21. คูแมสซีบลู บริษัท Fluka, Switzerland
22. กรดฟอสฟอริก บริษัท Mallinckrodt chemicals, USA
23. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
24. เมทานอล บริษัท Merck, Germany
25. อะซีโตน บริษัท Merck, Germany
26. ไอโซโพรพานอล บริษัท Merck, Germany
27. n-บิวทานอล บริษัท Merck, Germany
28. แซนแทนกัม บริษัท Sigma Chemical Co., USA
29. กัวกัม บริษัท Success chemical, Thailand
30. น้ำมันถั่วเหลือง ตรากุ๊ก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช ประเทศไทย
31. น้ำมันมะกอก บริษัท Sabroso, Spain
32. โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
33. โพแทสเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
34. แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
35. คอปเปอร์ซัลเฟส บริษัท Carlo Erba, Italy
36. เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride)
37. ถ่านกัมมันต์ Merck, Germany
38. 1,1-ไดฟีนิล-2-พิคริลไฮดราซิล (DPPH) บริษัท Fluka, Switzerland
39. อะราบิโนส บริษัท Fluka, Switzerland
40. ฟรุกโตส (Fructose) บริษัท Fluka, Switzerland
41. กาแลกโทส บริษัท Difco, USA
42. แมนโนส บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
43. แรมโนส บริษัท Difco, USA
44. ไรโบส บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
45. ไซโลส บริษัท Difco, USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
46. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บริษัท Merck, Germany
47. เททระเมทิลพาราฟีนิลีนไดอะมีน ไดคลอโรไฮโดรเจนคลอไรด์ บริษัท Fluka, Switzerland

48. MacConkey สำเร็จรูป บริษัท Difco, USA
49. ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
50. ทริปโตน บริษัท Difco, USA
51. อาหารเหลว TSI สำเร็จรูป บริษัท Difco, USA
52. พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ บริษัท Fluka, Switzerland
53. ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd, Australia
54. น้ำส้มสายชูกลั่น 5% ตราภูเขาทอง บริษัท ไทยเทพรส ประเทศไทย
55. โซเดียมเบนโซเอต บริษัท Merck, Germany
56. เกลือ ตราปรุงทิพย์ บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด ประเทศไทย

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากผักดอง

คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากผักดอง โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม ชลบุรี และอุดรธานี ตัวอย่างผักดองที่เก็บ ได้แก่ ผักกาดดอง 5 ตัวอย่าง หน่อไม้ดอง 6 ตัวอย่าง และ มะนาวดอง 1 ตัวอย่าง คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างโดยการนำลูปเขี่ยตัวอย่างแล้วนำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนี แล้วนำไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่รอบโคโลนีเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงว่า มีการสร้างกรด นำโคโลนีนั้นไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยสังเกตจากโคโลนีที่มีลักษณะเมือกเยิ้ม (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) นำโคโลนีที่สร้างเมือกมาย้อมแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลสเพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จากนั้นเก็บรักษาสายพันธุ์แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อนำไปผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

3.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาและการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

นำโคโลนีที่สร้างเมือกจากข้อ 3.3.1 มาตรวจสอบเบื้องต้นว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังนี้

3.3.2.1 ศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากข้อ 3.3.1 มาย้อมแกรม เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียและการติดสีแกรม ผลที่ได้ถ้าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะมีลักษณะรูปร่างกลมหรือแท่ง และติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต

3.3.2.2 ทดสอบเอนไซม์แคทาเลส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากข้อ 3.3.1 บนลงแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อ ผลที่ได้ถ้าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะไม่เกิดฟองแก๊สขึ้น แสดงว่าผลทดสอบเป็นลบ

3.3.3 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

ขีดเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่พิสูจน์เบื้องต้นว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากข้อ 3.3.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแบบเอียง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบเอียงใหม่ทุก 1 สัปดาห์

3.3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เขี่ยเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่พิสูจน์เบื้องต้นว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากข้อ 3.3.2 ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มี 4% ซูโครส (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.0 นำสารละลายเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.4 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จากข้อ 3.3.3.1 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มี 4% ซูโครส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อข้างต้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

(ภาคผนวก ก) ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.4.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.4.1 ปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.4.3 การสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.4.2 มาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อตกตะกอนเซลล์และโปรตีน (Lin และ Chien, 2007) นำไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลเย็น ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที (Kumar และคณะ, 2004) เก็บตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลเย็น ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีกครั้ง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที เก็บตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งที่อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นนำไปใส่เดซิเคเตอร์ เพื่อให้น้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ รายงานเป็นหน่วย กรัมต่อลิตร

3.3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.5.1 ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากข้อ 3.3.4.3 มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดฝาเกลียว แล้วใส่กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก

ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ 1 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปส่งฉีดวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.3.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 % (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายคูแมสซีบลู (Coomassie blue) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.5.2.3 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น จากนั้นสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

3.3.5.2.4 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำเหมือนข้างต้นโดยจุ่มในน้ำกลั่นอีกหนึ่งชุด จากนั้นวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) คือ ระยะทางของเหลวในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่เคลื่อนที่ได้ ต่อระยะทางของน้ำกลั่นที่เคลื่อนที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ถ้าเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงถึง ความสามารถในการอุ้มน้ำสูง โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น (Tako และคณะ, 1982)

3.3.5.2.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผสม

ด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น

3.3.6 การคัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่เหมาะสม

คัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และสมบัติต่างๆที่ทดสอบข้างต้นคือ ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำที่ดี และความสามารถในการก่ออิมัลชันที่ดี จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน และนำไปทดสอบสมบัติอื่นๆเพิ่มเติมต่อไป

3.3.7 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.3.7.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตลักษณะโคโลนี และย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่างแบคทีเรีย และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.7.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.3.7.2.1 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristics and Biochemical test)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารต่างๆ และ ทดสอบทางชีวเคมีโดยวิธีอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994; Kandler และ Weiss, 1986) ดังนี้

3.3.7.2.1.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (Catalase test)

เขี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อ ถ้าไม่เกิดฟองแก๊สขึ้น แสดงว่าผลทดสอบเป็นลบ

3.3.7.2.1.2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

หยดสารละลายรีเอเจนต์ 1% เททระเมทิลพาราฟีนิลีนไดอะมีน ไดคลอโรไฮโดรเจนคลอไรด์ ในน้ำเกลือปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข) บนแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อ และขีดเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงบนแผ่นกระดาษกรอง ถ้าไม่เกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรองภายใน 10 วินาที ผลการทดสอบเป็นลบ

3.3.7.2.1.3 การศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง MacConkey

ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MacConkey (ภาคนวก ก) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลดูการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อไม่เจริญแสดงว่าเป็นแกรมบวก ถ้าเชื้อเจริญแสดงว่าเป็นแกรมลบ และเชื้อที่สามารถย่อยแล็กโทสได้จะมีโคโลนีเป็นสีชมพูอ่อน

3.3.7.2.1.4 ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test)

นำเชื้อใส่ลงใน Motility test medium (ภาคผนวก ก) โดยปักเชื้อตรงๆ (stab) ประมาณ 2/3 ของส่วนลูป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าเห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยปักเชื้อ ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.7.2.1.5 ทดสอบการเกิดอินโดล (Indole test)

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว Tryptophan (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หยดสาร Kovac's reagent (ภาคผนวก ข) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด จากนั้นเขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าสีของรีเอเจนต์เปลี่ยนไปเป็นสีแดง ผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.7.2.1.6 การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction

ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส แลกโทส และซูโครสของแบคทีเรีย ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรด และอาจจะให้แก๊สด้วย นอกจากนี้ยังสามารถทดสอบความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนซัลไซด์ (H_2S) โดยจะนำเชื้อขีดบนหน้าวุ้นของอาหาร TSI agar slant (ภาคผนวก ก) และปักเชื้อลงไปในอาหารประมาณ 2/3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 –24 ชั่วโมง โดยดูผลดังนี้

การหมักน้ำตาลต่างๆ

1. ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียว สีแดงส้มของอาหารบนผิววุ้น (slant) จะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (bott) จะเปลี่ยนจากสีแดงส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) อ่านผลว่า K/A

2. ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลกโทส หรือสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักน้ำตาลได้ทั้งสามชนิด ทั้งบนผิววุ้น และก้นหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนสีแดงส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด อ่านผลว่า A/A

3. ถ้าแบคทีเรียไม่สามารถหมักน้ำตาลใดๆได้เลย จะอ่านผลได้ 3 แบบ คือ N/N K/N และ K/K โดย N คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ K คือ เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม

3.3.7.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ L06 และ L07 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ16S ribosomal DNA โดยนำสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในอาหารแข็งชนิดอียง ส่งไปที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยใช้ universal primer คือ BF1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ BR1 (5'-AAGTCGTAACAAGGTAACCG-3') เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแล้ว นำมาตัดแต่งและปรับแนวลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University) นำข้อมูลที่ได้ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

ด้วยโปรแกรม BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.8 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.3.8.1 การทดสอบความสามารถการเกิดเจล (gelation)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2 M NaOH ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ เกลือของโลหะ (Metal salts) ได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ตามลำดับ ปริมาณ 2 มิลลิกรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร แล้วตรวจสอบการเกิดเจล (gelation) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Prasertsan และคณะ, 2006)

3.3.8.2 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 N เติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ถ้าพบตะกอนในสารละลายแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง

3.3.8.3 ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) ของพอลิแซ็กคาไรด์

ดำเนินการตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Wang และคณะ (2008) และ Yun และ Park (2003) โดยนำสารละลายของผงถ่านกัมมันต์ (Charcoal-activated carbon) ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยมีการแปรผันความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

แล้วดูดส่วนน้ำใสชั้นบน (upper phase) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับกัวกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์และคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) จากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\% \text{ Flocculating activity} = (B-A)/B \times 100 \times \text{dilution rate}$$

<u>หมายเหตุ</u>

A = ค่าความขุ่นของสารละลายที่มีส่วนผสมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

B = ค่าความขุ่นของสารละลายที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.8.4 ความคงตัวของอิมัลชัน

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผสมด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yun และ Park (2003) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งใช้วิธีเดียวกับข้างต้น

3.3.8.5 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

นำพอลิแซ็กคาไรด์แห้งที่ผลิตจากสายพันธุ์ L06 และ L07 ปริมาณ 10–20 มิลลิกรัม มาไปส่งวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer TGA 7 thermogravimetric analyzer ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2004)

3.3.8.6 การวัดน้ำหนักมวลโมเลกุล

ละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ในน้ำกลั่นความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร นำไปส่งวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลเฉลี่ยด้วยเครื่อง Gel permeation chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-10A dvp ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ PL aquagel-OH 30 ภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับสารมาตรฐานพูลลูแลน (น้ำหนักมวลโมเลกุล 342 1,320 6,000 10,000 21,700 และ 48,800 ดาลตัน)

3.3.8.7 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

นำพอลิแซกคาไรด์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ L06 และ L07 มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % โดยมวลต่อปริมาตร ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ใน เอทานอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลแทน DPPH เป็น blank และใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นชุดควบคุม โดยเปรียบเทียบยกับแซนแทนกัม และวิตามินซี นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้ (Yang และคณะ, 2010)

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{(A - B)}{C}\right] \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนแสงของblank

C = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

3.3.8.7 การวัดความหนืด

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยมวลต่อปริมาตร แล้วมาวัดสมบัติการไหลและความหนืดด้วยเครื่อง Rheometer Bohlin รุ่น C-

VOR โดยประมวลผลด้วยโปรแกรม Bohlin software CVOR15 ที่อัตราเฉือนระหว่าง 0.05 -300 วินาที$^{-1}$ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Rao และ Goyal, 2012)

3.3.9 การคัดเลือกสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในอาหาร

คัดเลือกสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ L06 และ L07 ที่สามารถนำไปประยุกต์ในอาหารได้ โดยพิจารณาจากผลทดลองการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพในข้อ 3.3.5 และ 3.3.8 ผลทดลองที่จะนำไปใช้เพื่อประยุกต์ในอาหารต่อไป จะวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้วิธี ANOVA (analysis of variance) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 (Polar Engineering and Consulting company) และเปรียบเทียบความแตกต่าง (Significant differences; $p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยทดสอบด้วย Least Significant Different (LSD) โดยถ้า $p < 0.05$ แสดงว่า ค่าเฉลี่ยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อ 95 % และ $p > 0.05$ แสดงว่า ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อ 95 %

3.3.10 การประยุกต์ในน้ำสลัด

3.3.10.1 เตรียมน้ำสลัด

เตรียมอิมัลชันชนิดไขมันในน้ำ (oil in water emulsion) 50% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยดัดแปลงส่วนผสมตามวิธี Koh และคณะ(2008) โดยนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ละลายในน้ำส้มสายชู 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.4%w/v เติมโซเดียมเบนโซเอต 0.1%w/v เกลือ12 %w/v น้ำตาล 50%w/v และไข่แดง 15 %w/v ลงไปขณะที่ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นอาหาร ค่อยๆเติมน้ำมันมะกอก ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน

3.3.10.2 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และขนาดอนุภาคของอิมัลชัน

พิจารณาลักษณะและถ่ายภาพอิมัลชันในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า ภายหลังการเกิดอิมัลชัน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะเปรียบเทียบกับน้ำสลัดที่ไม่ได้ใส่พอลิแซ็กคาไรด์และที่ใส่แซนแทนกัม วิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size distribution) ของอิมัลชันโดยใช้โปรแกรม Imagej (National Institutes of Health, USA) (Prasanna และคณะ, 2012) และคำนวณค่า d_{32} (volume-surface mean diameters) (De Assis Perrechi และคณะ, 2010) ตามสูตรดังนี้

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$

โดย n_i คือ จำนวนอนุภาคแต่ละอนุภาคที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง d_i

3.3.10.3 การทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability)

นำน้ำสลัดที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.10.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร สูง 6 เซ็นติเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการแยกชั้นภายใน 9 วัน โดยความคงตัวของอิมัลชันจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อความสูงอิมัลชันทั้งหมด (%serum) (de Assis Perrechi และคณะ, 2010) ซึ่งจะเปรียบเทียบกับน้ำสลัดที่ไม่ได้ใส่พอลิแซ็กคาไรด์และที่ใส่แซนแทนกัม

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ได้จากผักดอง

ทำการคัดแยกแล็กติกซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างผักดอง ได้แก่ ผักกาดดอง 5 ตัวอย่าง หน่อไม้ดอง 6 ตัวอย่าง และ มะนาวดอง 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม ชลบุรี และอุดรธานี คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple และคัดเลือกโคโลนีที่ผลิตกรดได้มาทดสอบดูความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทั้งนี้สามารถคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียได้จากหน่อไม้ดองจำนวน 3 ตัวอย่าง และผักกาดดอง 1 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้พบแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้จากหน่อไม้ดอง 1 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากจังหวัดนครปฐม จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งได้รับการกำหนดรหัสเป็น L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 และ L08 โดยผลการคัดแยกแล็กติกแอซิดจากผักดองได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และความกว้าง ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลตของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่คัดแยกได้จากผักดองทั้งหมด

ลำดับ	ตัวอย่างผักดอง	แหล่งที่มา (จังหวัด)	จำนวนไอโซเลต		การให้รหัสเชื้อ
			แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์	
1	ผักกาดดอง	นครปฐม	ไม่พบ	ไม่พบ	-
2	หน่อไม้ดองเส้น	นครปฐม	14	ไม่พบ	-
3	หน่อไม้ดองแผ่น	นครปฐม	ไม่พบ	ไม่พบ	-
4	หน่อไม้ดองแผ่น	กรุงเทพฯ	ไม่พบ	ไม่พบ	-
5	ผักกาดดอง	กรุงเทพฯ	ไม่พบ	ไม่พบ	-
6	หน่อไม้ดองลูกเต๋า	นครปฐม	12	8	L01-L08
7	มะนาวดอง	นครปฐม	ไม่พบ	ไม่พบ	-
8	ผักกาดดอง	ชลบุรี	6	ไม่พบ	-

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลตของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่คัดแยกได้จากผักดองทั้งหมด (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างผักดอง	แหล่งที่มา (จังหวัด)	จำนวนไอโซเลต		การให้รหัสเชื้อ
			แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์	
9	ผักกาดดองเค็ม	อุดรธานี	ไม่พบ	ไม่พบ	-
10	ผักกาดดองหวาน	อุดรธานี	ไม่พบ	ไม่พบ	-
11	หน่อไม้เส้น	อุดรธานี	ไม่พบ	ไม่พบ	-
12	หน่อไม้แผ่น	อุดรธานี	3	ไม่พบ	-

ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงแข็งที่คัดแยกได้จากหน่อไม้ดอง

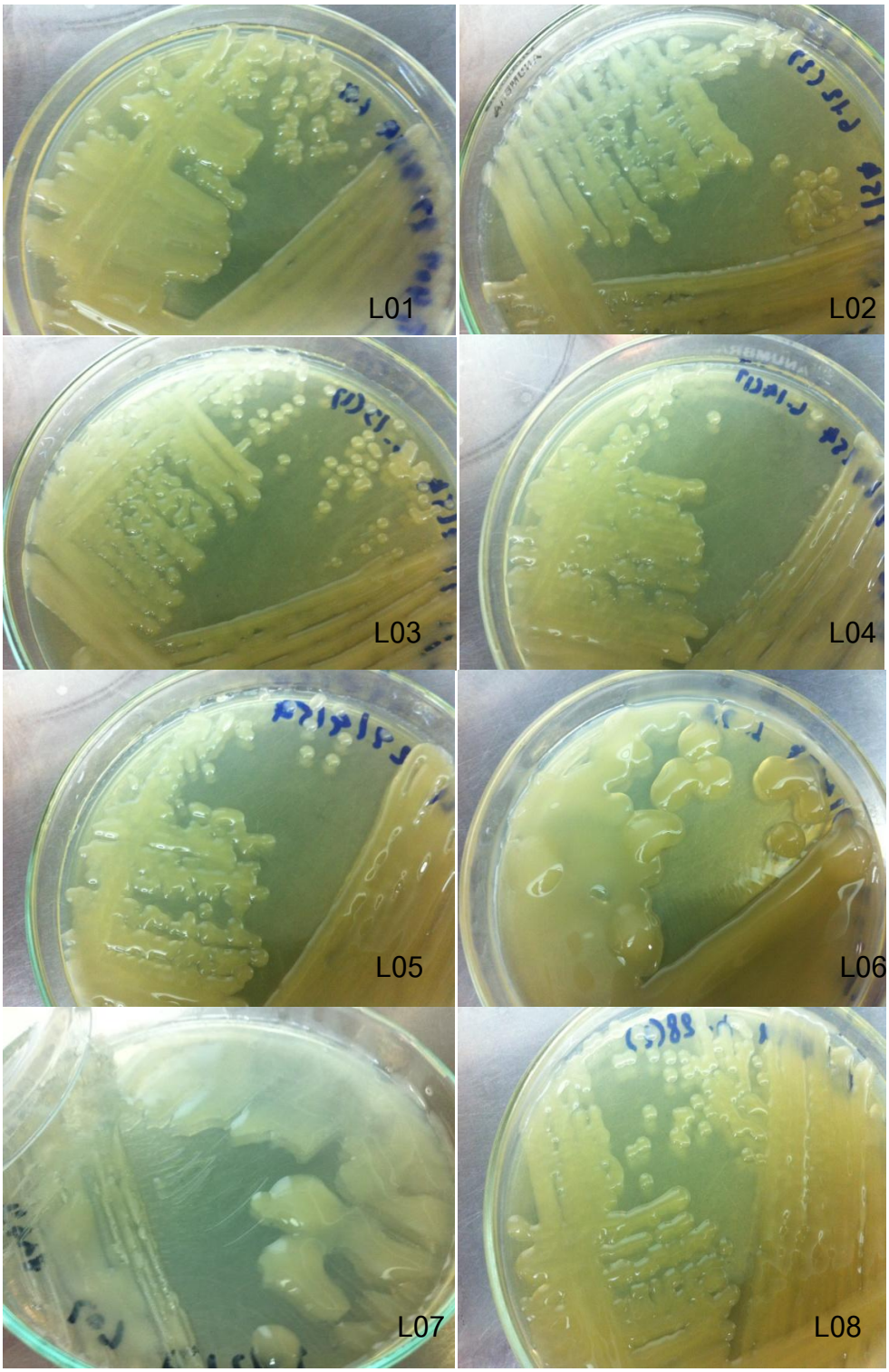
รหัสเชื้อ	ความกว้างของโคโลนีที่มีลักษณะเมือก
L01	+
L02	+
L03	+
L04	+
L05	+
L06	+++
L07	+++
L08	+

หมายเหตุ : **ความกว้างของโคโลนีแทนด้วยเครื่องหมาย (+) ที่วัดได้**

\+ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.0 มิลลิเมตร

++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีอยู่ระหว่าง 5.0 - 10.0 มิลลิเมตร

+++ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าหรือเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย L01-L08 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

4.2 สัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก

ตรวจลักษณะการย้อมติดสีแกรมและรูปร่าง และความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลสเพื่อเป็นการพิสูจน์เบื้องต้นว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 ทั้งนี้หากแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างกลมหรือแท่ง ติดสีม่วง และให้ผลทดสอบเอนไซม์ แคทาเลสเป็นลบ จะจัดได้ว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การย้อมแกรม และการทดสอบเอนไซม์แคทาเลสของไอโซเลต L01 – L08

รหัสเชื้อ	การย้อมแกรม		การทดสอบเอนไซม์
	การติดสี	รูปร่าง	แคทาเลส
L01	ม่วง	แท่งสั้น	-
L02	ม่วง	แท่งสั้น	-
L03	ม่วง	แท่งสั้น	-
L04	ม่วง	แท่งสั้น	-
L05	ม่วง	ค่อนข้างกลม แท่งสั้น	-
L06	ม่วง	แท่งยาว	-
L07	ม่วง	แท่งสั้น	-
L08	ม่วง	แท่งสั้น	-

หมายเหตุ - คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา ไม่เกิดฟองแก๊ส

จากตารางที่ 4.3 พบว่าทั้ง 8 ไอโซเลต มีการติดสีย้อมแกรมเป็นสีม่วงทั้งหมด มีรูปร่างเป็นแท่ง และผลทดสอบเอนไซม์แคทาเลสเป็นลบ จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า ทั้ง 8 ไอโซเลตเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

4.3 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้

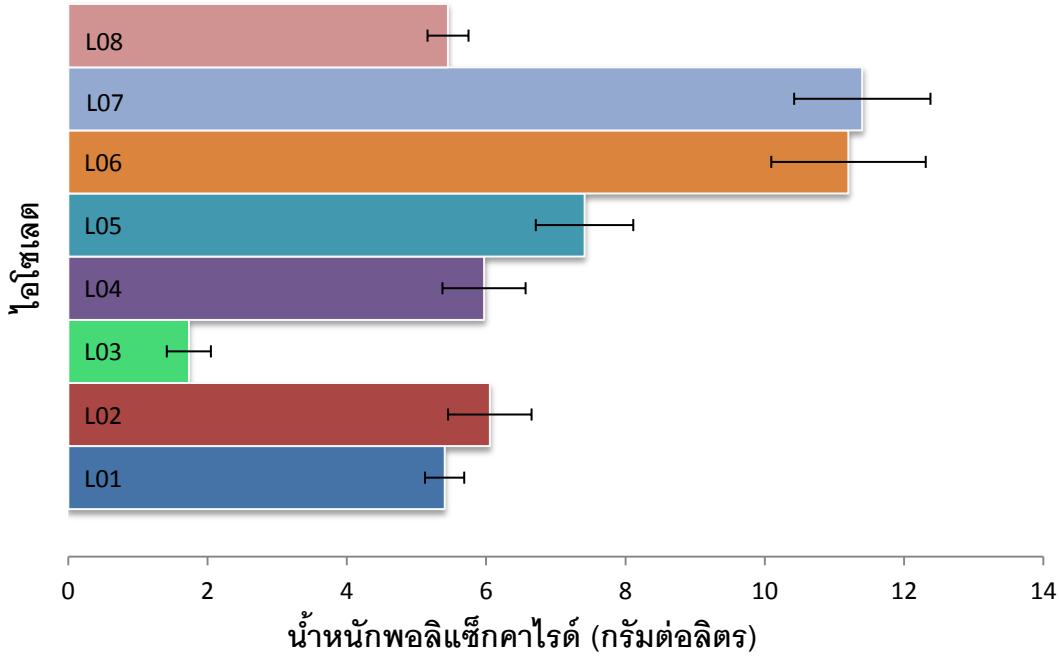
ตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของไอโซเลต L01 – L08 โดยการนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.4.3 ชั่งน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัด

ได้ รายงานน้ำหนักแห้งเป็น กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก 8 ไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต L03 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด เท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร ส่วนไอโซเลต L01 L02 L04 L05 และ L08 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปานกลางอยู่ในช่วง 5.40 – 7.41 กรัมต่อลิตร ส่วนไอโซเลต L06 และ L07 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด และได้ปริมาณใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ดังผลในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08

ไอโซเลต	น้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)
L01	5.40 ± 0.28
L02	6.05 ± 0.60
L03	1.73 ± 0.32
L04	5.97 ± 0.60
L05	7.41± 0.70
L06	11.20 ± 1.11
L07	11.40 ± 0.98
L08	5.45 ± 0.29

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียไอโซเลต L01- L08 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

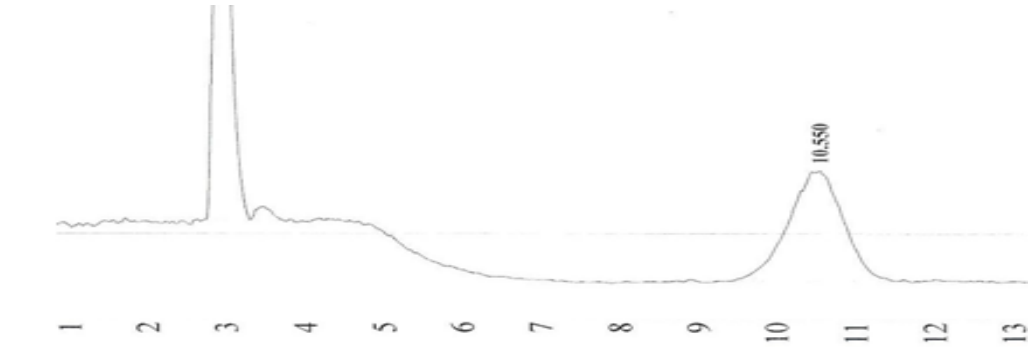
4.4.1 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียไอโซเลต L01 – L08 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 กรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วส่งวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโท กราฟี ภาวะตามข้อ 3.3.5.1 โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐานจากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ ซึ่งผลของส่วนประกอบชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

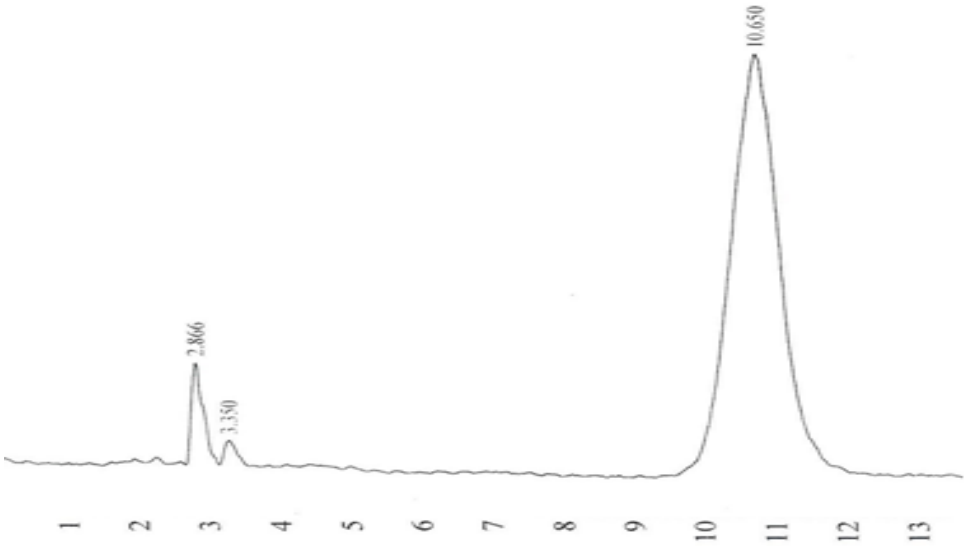
ตารางที่ 4.5 ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L01- L08 หลังจากย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลาย 80% โดยปริมาตร อะซิโตไนไทรล์เป็นตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ไอโซเลต	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
L01	กลูโคส
L02	กลูโคส
L03	กลูโคส
L04	กลูโคส
L05	กลูโคส
L06	กลูโคส
L07	กลูโคส
L08	กลูโคส

แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมที่แสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L06 โดยเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.3



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมแสดง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และ (ข) ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L06 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากตารางที่ 4.5 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์แล็กติกแอซิดที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L01 – L08 เป็นชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเรียกว่า กลูแคน (Monsan และคณะ, 2001) จากการรายงานก่อนหน้าพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคสที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะอยู่ในสกุล *Leuconostoc*, *Lactobaciilus* และ *Weisella* (Korakli และ Vogel, 2006)

4.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละไอโซเลต พบว่า มีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง แสดงดังตารางที่ 4.6

4.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976) ผลของปริมาณโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละไอโซเลต พบว่า มีปริมาณโปรตีนต่ำ แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 – L08

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ (%w/w)	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ (%w/w)
L01	99.61	2.15
L02	77.61	3.55
L03	81.83	0.15
L04	71.83	3.45
L05	65.06	3.95
L06	73.39	2.25
L07	88.61	2.75
L08	77.61	3.45

4.4.3 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 – L08 ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาทดสอบการละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปรียบเทียบความสามารถในการละลายกับแซนแทนกัม ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 - L08 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ อุณหภูมิห้อง		
	น้ำกลั่น	เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล	ลักษณะความหนืด
L01	++	-	ความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัมมาก
L02	++	-	
L03	++	-	
L04	++	-	
L05	++	-	
L06	++	-	
L07	+++	-	
L08	++	-	
แซนแทนกัม	+++	-	ความหนืดสูง

หมายเหตุ : ความสามารถการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์แทนด้วยเครื่องหมาย (+)

- \- ไม่ละลาย เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด
- \+ ละลายได้ต่ำ (ละลายได้เล็กน้อย ยังมีตะกอนอยู่มาก)
- ++ ละลายได้ปานกลาง (ละลายได้บางส่วน ยังมีตะกอนอยู่)
- +++ ละลายได้ดี (ละลายได้หมด)

จากตารางที่ 4.7 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 L02 L03 L04 L05 L06 และ L08 ละลายในน้ำกลั่นได้ปานกลาง ยกเว้นไอโซเลต L07 ที่ละลายได้ดีในน้ำกลั่น และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากทั้ง 8 ไอโซเลตไม่ละลายในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล และมีความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัมมาก

4.4.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำ

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 - L08 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ โดยจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำเหมือนข้างต้นโดยจุ่มในน้ำกลั่นอีกหนึ่งชุด จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (%syneresis) หากเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง ผลของการทดสอบแสดงดังในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 - L08

ไอโซเลต	อัตราการสกัดของเหลวออกจาก พอลิแซ็กคาไรด์ (%)
L01	71.41 ± 0.085
L02	73.82 ± 0.054
L03	68.30 ± 0.099
L04	67.62 ± 0.032
L05	82.85 ± 0.13
L06	87.29 ± 0.079
L07	80.91 ± 0.090
L08	73.26 ± 0.028
แซนแทนกัม	9.15 ± 0.0032
คาราจีแนน	46.14 ± 0.051
กัวกัม	35.73 ± 0.034

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.8 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์สูง แสดงว่า มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ โดยต่ำกว่าแซนแทนกัม คาราจีแนน และกัวกัมที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าอย่างชัดเจน

4.4.5 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 ตามวิธีการทดลองข้อ 4.5 แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity) ผลทดลองแสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L01 –L08 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กับน้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1

ไอโซเลต	Emulsifying activity (%) ที่ความเข้มข้น 0.1%	
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันมะกอก
L01	46.98±0.005	47.22±0.005
L02	46.16±0.018	48.47±0.018
L03	46.66±0.027	49.26±0.017
L04	46.51±0.002	48.48±0.007
L05	47.60±0.011	48.37±0.014
L06	46.88±0.011	47.63±0.012
L07	46.06±0.009	48.85±0.001
L08	46.56±0.019	48.52±0.017
แซนแทนกัม	46.67±0.00	48.25±0.043

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.9 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตมีค่า Emulsifying activity ใกล้เคียงกันทั้งในน้ำมันถั่วเหลือง และ น้ำมันมะกอก และยังมีค่าใกล้เคียงกับแซนแทนกัม จึงได้วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าค่า Emulsifying activity มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก ช) แสดงว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตมีความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเทียมเท่ากับแซนแทนกัม

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียไอโซเลต L01 – L08 ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่า สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์เที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ สามารถละลายน้ำได้ปานกลาง ยกเว้น พอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L07 จะละลายน้ำได้ดี ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความหนืดต่ำ มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม เนื่องจากทั้ง 8 ไอโซเลตมีสมบัติใกล้เคียงกัน จึงได้พิจารณาจากความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงแทน ซึ่งได้คัดเลือกไอโซเลต L06 และ L07 ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูง เท่ากับ 11.20 และ 11.40 ตามลำดับ มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานและนำไปทดสอบสมบัติอื่นๆเพิ่มเติมต่อไป

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L01-L08

แบคทีเรียไอโซเลต	น้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ (g/l)	ชนิดน้ำตาล	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	อัตราการสกัดของเหลว (%)	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร*		Emulsifying activity (%) ที่ความเข้มข้น 0.1%	
						น้ำกลั่น	methanol, acetone, isopropanol, n-butanol	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันมะกอก
L01	5.40±0.28	กลูโคส	99.61	2.15	71.41±0.085	++	-	46.98±0.005	47.22±0.005
L02	6.05±0.60	กลูโคส	77.61	3.55	73.82±0.054	++	-	46.16±0.018	48.47±0.018
L03	1.73±0.32	กลูโคส	81.83	0.15	68.30±0.099	++	-	46.66±0.027	49.26±0.017
L04	5.97±0.60	กลูโคส	71.83	3.45	67.62±0.032	++	-	46.51±0.002	48.48±0.007
L05	7.41±0.70	กลูโคส	65.06	3.95	82.85±0.13	++	-	47.60±0.011	48.37±0.014
L06	11.20±1.11	กลูโคส	73.39	2.25	87.29±0.079	++	-	46.88±0.011	47.63±0.012
L07	11.40±0.98	กลูโคส	88.61	2.75	80.91±0.090	+++	-	46.06±0.009	48.85±0.001
L08	5.45±0.29	กลูโคส	77.61	3.45	73.26±0.028	++	-	46.56±0.019	48.52±0.017

หมายเหตุ: ความสามารถการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์แทนด้วยเครื่องหมาย (+)

- \- ไม่ละลาย เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด
- \+ ละลายได้ต่ำ (ละลายได้เล็กน้อย ยังมีตะกอนอยู่)
- ++ ละลายได้ปานกลาง (ละลายได้บางส่วน)
- +++ ละลายได้ดี (ละลายได้หมด)

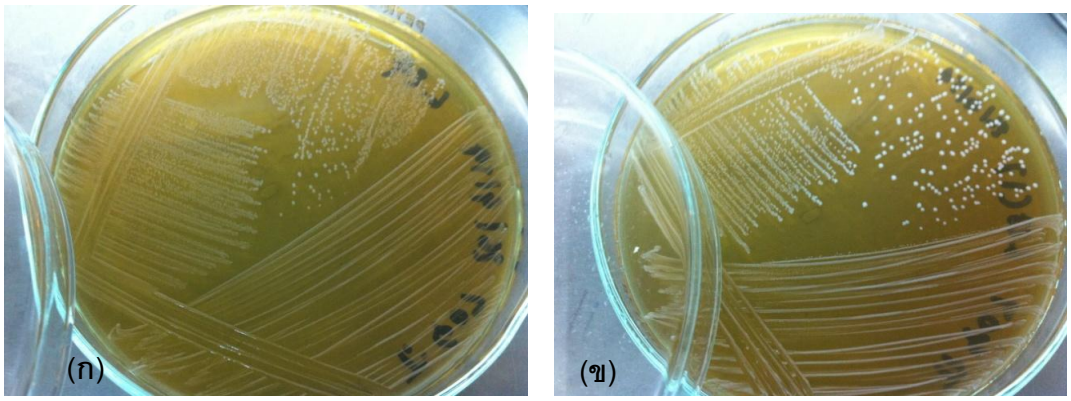
4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาและเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

4.5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

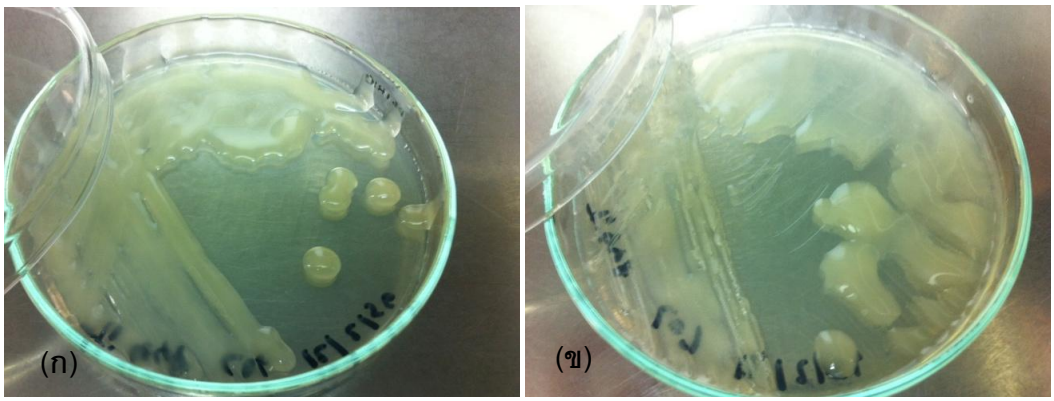
นำแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มี และไม่มี 4% น้ำตาลซูโครส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตลักษณะโคโลนีที่ไม่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ และ โคโลนีที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ และย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่างแบคทีเรีย และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.4 - 4.6

ตารางที่ 4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07

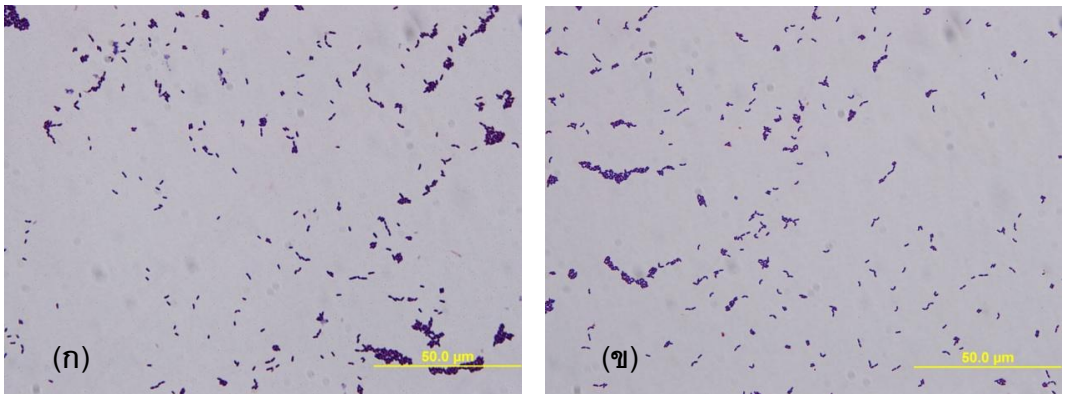
ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ		การย้อมแกรม	
	MRS	MRS+4%ซูโครส	รูปร่าง	การติดสี
L06	กลม สีขาว โปร่งแสง ขนาดเล็กมาก เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.05 cm	เป็นเมือก เยิ้มมาก อยู่ตัว เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.35 cm	แท่งสั้น มักอยู่เป็นแท่งคู่	ม่วง
L07	กลม สีขาว ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1 cm	เป็นเมือก เยิ้มมาก ไม่อยู่ตัว เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.2 cm	แท่งสั้น มักอยู่เป็นแท่งคู่	ม่วง



รูปที่4.4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต (ก) L06 และ (ข) L07 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS



รูปที่4.5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต (ก) L06 และ (ข) L07 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มี 4 % น้ำตาลซูโครส



รูปที่ 4.6 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลต (ก) L06 และ (ข) L07 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

4.5.2 เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

4.5.2.1 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristics and Biochemical test)

นำไอโซเลต L06 และ L07 มาทดสอบทางชีวเคมีโดยวิธีอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994; Kandler และ Weiss, 1986) โดยทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง MacConkey ความสามารถในการเคลื่อนที่ ทดสอบการเกิดอินโดล และทดสอบปฏิกิริยาใน Triple Sugar Iron (TSI) โดยมีผลแสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07

การทดสอบ	L06	L07
การสร้างเอนไซม์แคทาเลส	-	-
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-	-
การเจริญบนอาหารแข็ง MacConkey	-	-
การเคลื่อนที่	-	-
การเกิดอินโดล	-	-
Triple Sugar Iron (TSI) reaction	A/A	A/A
การเกิด H_2S (TSI)	-	-

หมายเหตุ + คือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ เกิดได้ หรือ เจริญได้

- คือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ ไม่เกิด หรือ ไม่เจริญ

A/A คือ เกิดแก๊สและกรด

จากตารางที่ 4.12 เมื่อทดสอบปฏิกิริยาต่างๆ ทางชีวเคมีแล้ว พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 จัดอยู่ในกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) อ้างอิงตาม Bergey's

Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994; Kandler และ Weiss, 1986)

4.5.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ตามวิธีข้อ 3.3.7.2.2 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ L06 จำนวน 1,464 bp (ภาคผนวก ง) และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ L07 จำนวน 1,428 bp (ภาคผนวก ง) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genblank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ L06 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Weissella cibaria* (AJ295989) และ *Weissella confusa* (M23036) 99% ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ L07 ก็มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Weissella confusa* (M23036) และ *Weissella cibaria* (AJ295989) 99% ตัวอย่างดังตารางที่ 4.13 และ 4.14

ตารางที่ 4.13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต L06 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank

ไอโซเลตแบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)
Weissella cibaria ไอโซเลต LMG 17699T	AJ295989	99
Weissella confuse ไอโซเลต DSM 20196	M23036	99
Weissella viridescens ไอโซเลต DSM 20410	M23040	96
Weissella paramesenteroides ไอโซเลต DSM 20288	M23033	96
Weissella soli ไอโซเลต DSM 14420	AY028260	96
Weissella minor ไอโซเลต DSM 20014	M23039	95

ตารางที่ 4.14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต L07 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank

ไอโซเลตแบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)
Weissella confuse ไอโซเลต DSM 20196	M23036	99
Weissella cibaria ไอโซเลต LMG 17699T	AJ295989	99
Weissella viridescens ไอโซเลต DSM 20410	M23040	97
Weissella paramesenteroides ไอโซเลต DSM 20288	M23033	96
Weissella minor ไอโซเลต DSM 20014	M23039	96
Weissella soli ไอโซเลต DSM 14420	AY028260	95

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L06 และ L07 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Weissella confusa* และ *Weissella cibaria* 99% เช่นกัน จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองไอโซเลตมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L06 และ L07 มีความคล้ายกัน 99% (ภาคผนวก ซ) จึงสรุปว่า ทั้งสองไอโซเลตเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ซึ่งมีความใกล้เคียงมากที่สุดกับแบคทีเรียในสกุล *Weissella confusa* และ *Weissella cibaria* (99%)

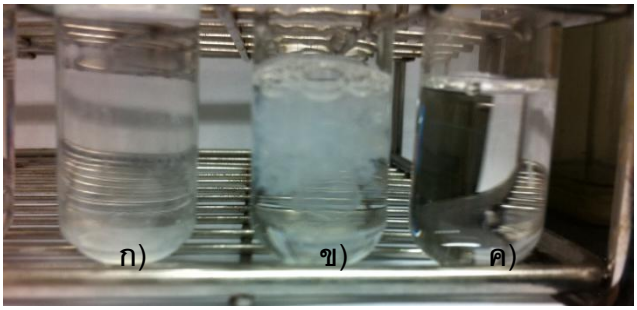
4.6 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก

4.6.1 ความสามารถการเกิดเจล (gelation)

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วทำการผสมกับเกลือของโลหะ ชนิดต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ความสามารถของการเกิดเจล ตามวิธีข้อ 3.3.8.1 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 ไม่มีความสามารถในการเกิดเจลได้ ขณะที่แซนแทนกัมมีความสามารถในการเกิดเจลได้เมื่อผสมกับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

4.6.2 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

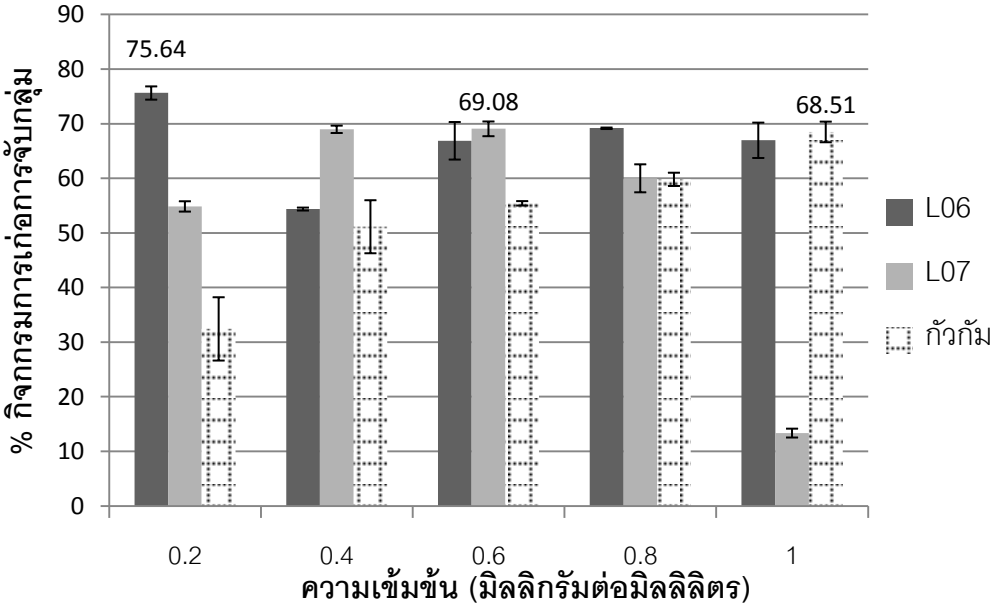
จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 มาวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ลงไป พบว่าทั้ง L06 และ L07 ไม่มีตะกอนของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เกิดขึ้น ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ขณะที่แซนแทนกัมเกิดเป็นตะกอนสีขาวซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) แสดงดังในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ตัวอย่างผลวิเคราะห์ชนิดประจุของ ก) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 ข) แซนแทนกัม (ชุดควบคุมบวก) และ ค) สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมลบ)

4.6.3 ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาวิเคราะห์ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีข้อ 3.3.8.3 แล้วคำนวณหากิจกรรมการเกิดการจับกลุ่ม (Flocculating activity) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.8 สมบัติความเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 เปรียบเทียบกับกัวกัม ที่ความเข้มข้น 0.2–1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากรูปที่ 4.8 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 มีค่า% กิจกรรมการก่อจับกลุ่มสูงสุดเท่ากับ 75.64 % ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า% กิจกรรมการก่อการจับกลุ่มลดลงที่ความเข้มข้น 0.4 -1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L07 มีค่า% กิจกรรมการก่อการจับกลุ่มสูงสุดเท่ากับ 69.08 % ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่กัวกัมมีค่า% กิจกรรมการก่อการจับกลุ่มสูงสุดเท่ากับ 68.51% ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ค่าสถิติของ% กิจกรรมการก่อจับกลุ่มสูงสุดของแต่ละกลุ่มโดยวิธี One-Way ANOVA พบว่า มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ระดับ

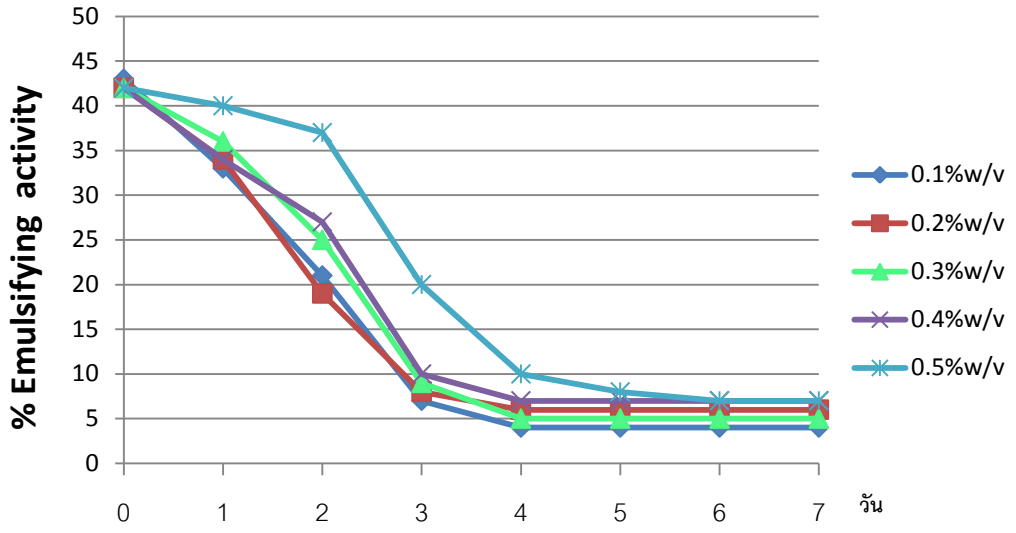
ความเชื่อมั่นที่ 95% (ภาคผนวก ช) แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์ได้ดีเท่ากัวกัม

4.6.4 ความคงตัวของอิมัลชัน

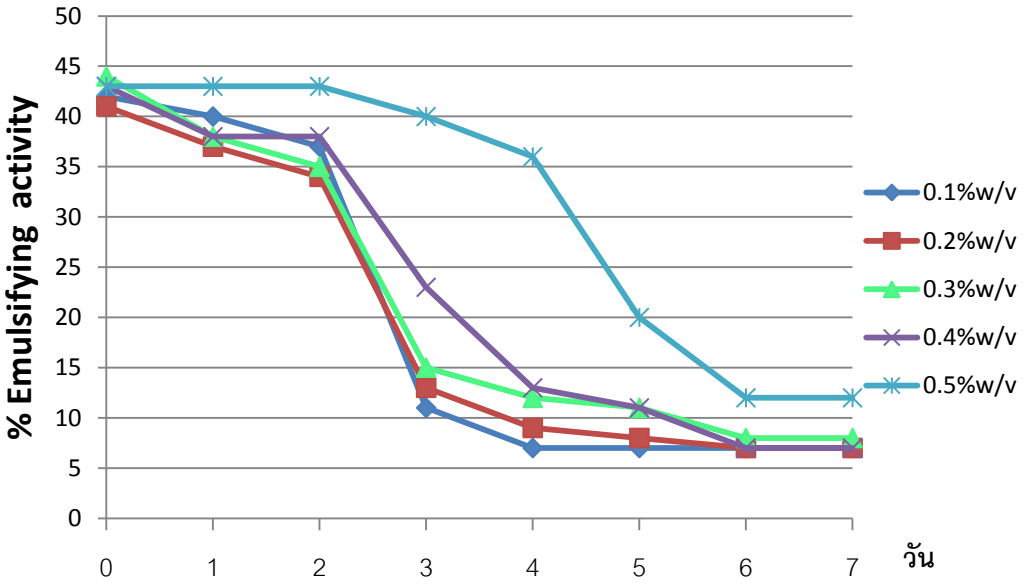
นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น เป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.7.4 แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.15 - 4.16 และรูปที่ 4.9 - 4.14

ตารางที่ 4.15 ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06, L07 และแซนแทนกัมกับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน

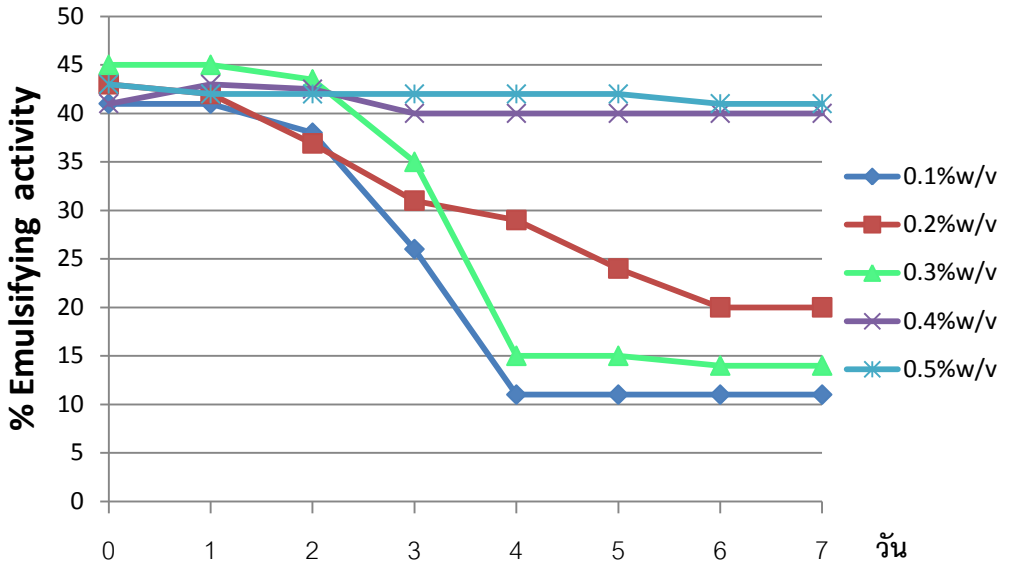
วัน	Emulsifying activity (%) ในแต่ละความเข้มข้น(% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)กับน้ำมันถั่วเหลือง														
	ความเข้มข้น (%w/v) ของ L06 EPS					ความเข้มข้น (%w/v) ของ L07 EPS					ความเข้มข้น (%w/v) ของแซนแทนกัม				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0	43	42	42	42	42	42	41	44	43	43	41	43	45	41	43
1	33	34	36	34	40	40	37	38	38	43	41	42	45	43	42
2	21	19	25	27	37	37	34	35	38	43	38	36.9	43.5	42.5	42
3	7	8	9	10	20	11	13	15	23	40	26	31	35	40	42
4	4	6	5	7	10	7	9	12	13	36	11	29	15	40	42
5	4	6	5	7	8	7	8	11	11	20	11	24	15	40	42
6	4	6	5	7	7	7	7	8	7	12	11	20	14	40	41
7	4	6	5	7	7	7	7	8	7	12	11	20	14	40	41



รูปที่ 4.9 ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06 กับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน



รูปที่ 4.10 ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L07 กับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน

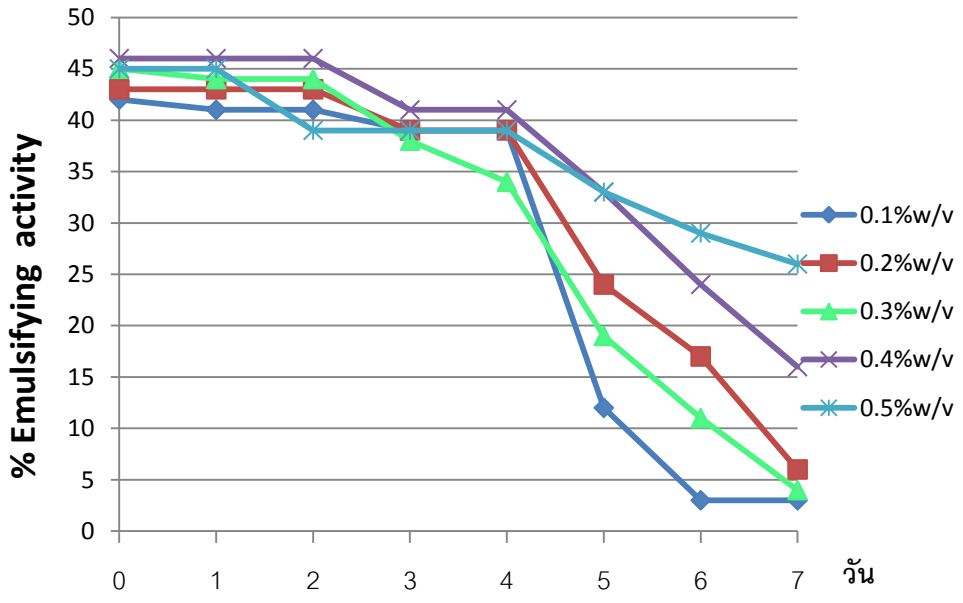


รูปที่ 4.11 ความคงตัวของอิมัลชันของแซนแทนกัมกับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน

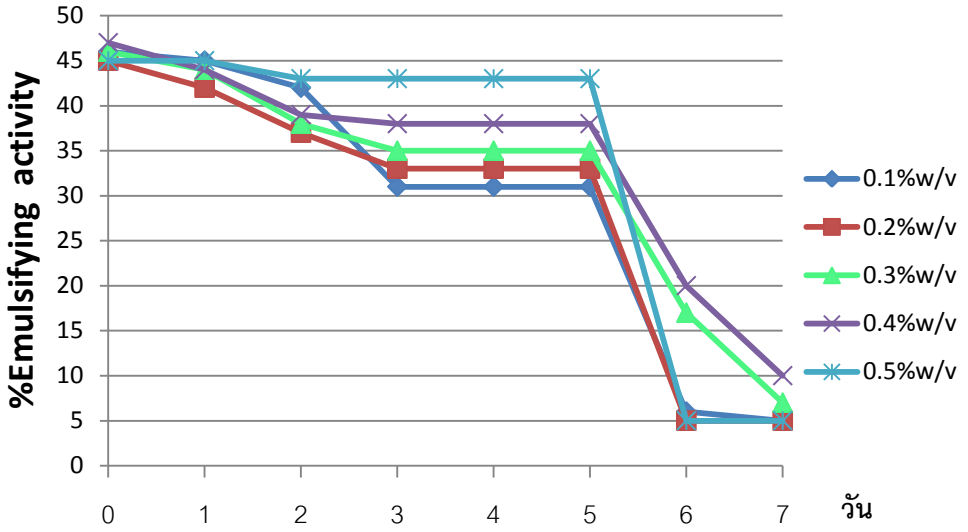
จากตารางที่ 4.15 และ รูปที่ 4.9 - 4.11 พบว่า การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันกับน้ำมันถั่วเหลืองของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 ที่ความเข้มข้น 0.5% พบว่า % emulsifying activity คงตัวได้นาน 2 วัน หลังจากนั้นลดลงอย่างรวดเร็ว และสามารถคงค่า% emulsifying activity มากที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ในระหว่างวันที่ 2 – 7 ส่วนการทดสอบความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L07 กับน้ำมันถั่วเหลือง พบว่า % emulsifying activity ที่ความเข้มข้น 0.5% มีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ในระหว่างวันที่ 2 – 7 และลดลงอย่างรวดเร็วหลังวันที่ 4 ส่วนความความคงตัวของอิมัลชันของแซนแทนกัมกับน้ำมันถั่วเหลือง พบว่า % emulsifying activity คงตัวได้นานที่สุดที่ความเข้มข้น 0.4 % และ 0.5% โดยคงตัวอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.16 ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06, L07 และแซนแทนกัมกับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน

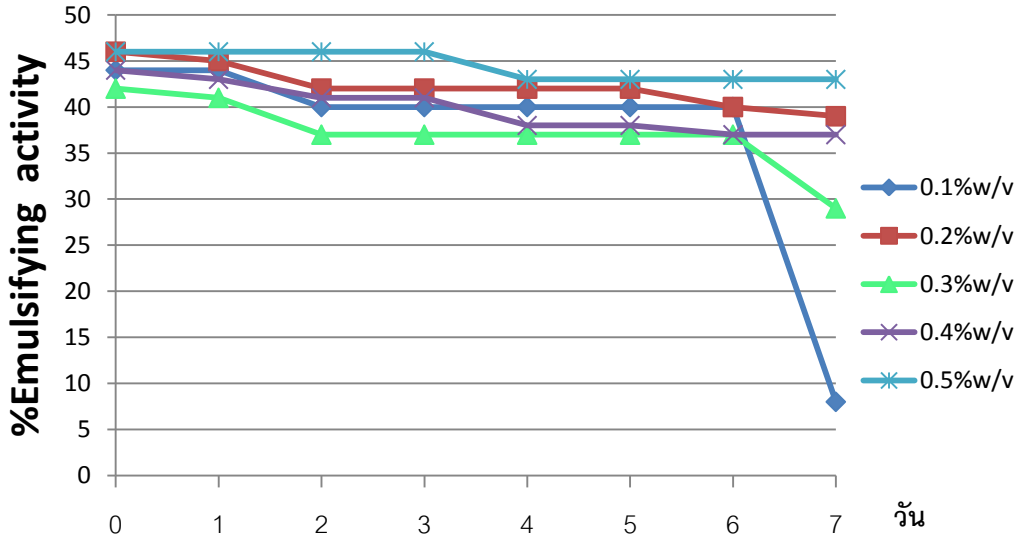
วัน	Emulsifying activity (%) ในแต่ละความเข้มข้น(% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)กับน้ำมันมะกอก														
	ความเข้มข้น (%w/v) ของ L06 EPS					ความเข้มข้น (%w/v) ของ L07 EPS					ความเข้มข้น (%w/v) ของ แซนแทนกัม				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0	42	43	45	46	45	46	45	46	47	45	44	46	42	44	46
1	41	43	44	46	45	45	42	44	44	45	44	45	41	43	46
2	41	43	44	46	39	42	37	38	39	43	40	42	37	41	46
3	39	39	38	41	39	31	33	35	38	43	40	42	37	41	46
4	39	39	34	41	39	31	33	35	38	43	40	42	37	38	43
5	12	24	19	33	33	31	33	35	38	43	40	42	37	38	43
6	3	17	11	24	29	6	5	17	20	5	40	40	37	37	43
7	3	6	4	16	26	5	5	7	10	5	8	39	29	37	43



รูปที่ 4.12 ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06 กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน



รูปที่ 4.13 ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L07 กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน



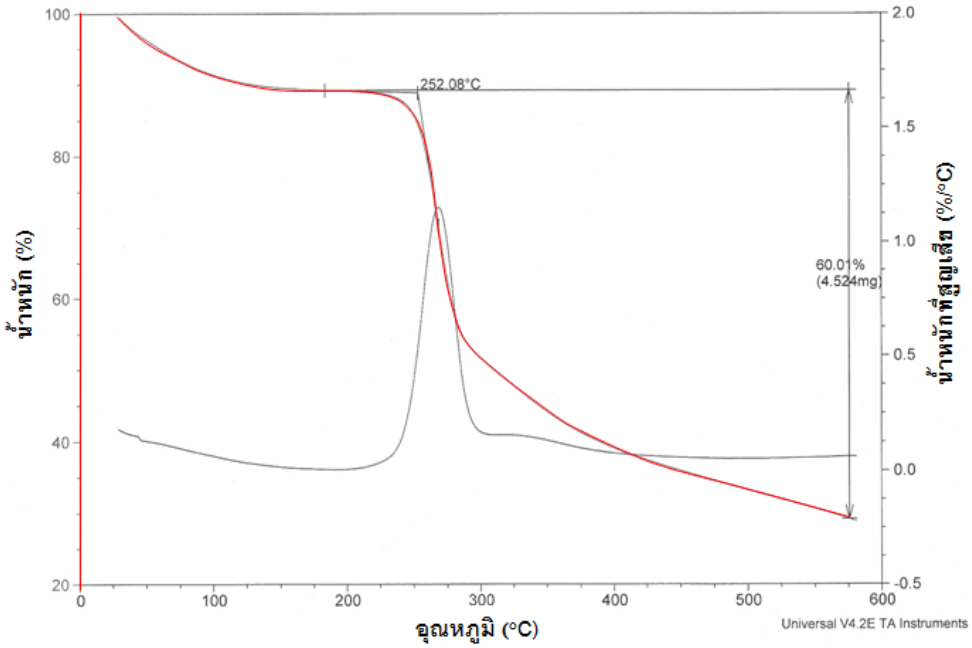
รูปที่ 4.14 ความคงตัวของอิมัลชันของแซนแทนกัมกับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1- 0.5%w/v ในเวลา 0-7 วัน

จากตารางที่ 4.16 และ รูปที่ 4.12 – 4.14 พบว่าการทดสอบความความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5% มีค่า emulsifying activity มีความคงตัวไปทางแนวโน้มเดียวกันในระยะเวลา 7 วัน โดยลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 แต่ในวันที่ 7 ที่ความเข้มข้น 0.4% และ 0.5% มี % emulsifying activity สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วนการทดสอบความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L07 กับน้ำมันมะกอก พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5% ค่า emulsifying activity มีความคงตัวไปทางแนวโน้มเดียวกันในระยะเวลา 7 วัน โดยค่าจะเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วหลังวันที่ 5 ส่วนแซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.5% มีค่า emulsifying activity มีความคงตัวไปทางแนวโน้มเดียวกันในระยะเวลา 7 วัน เช่นกัน โดยในวันที่ 7 ที่ความเข้มข้น 0.5% มีค่า emulsifying activity สูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ

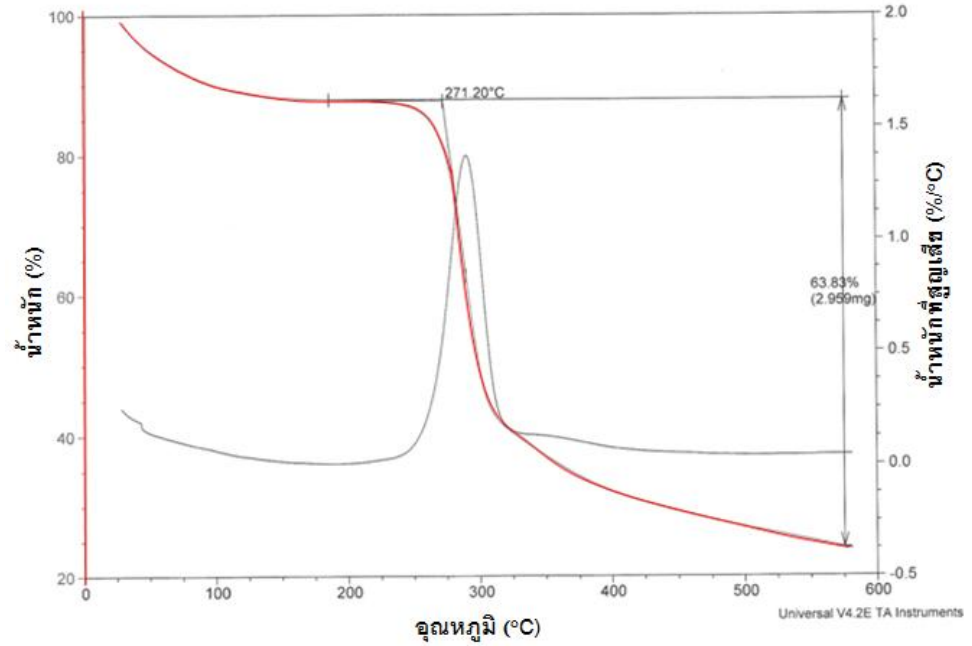
จากผลทั้งหมดของการทดสอบความคงตัวอิมัลชัน สรุปได้ว่า ความคงตัวอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก L06 และ L07 กับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 0.4 % w/v และ 0.5 % w/v สามารถคงตัวได้นานกว่า เมื่อทดสอบกับน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.5% w/v คือ คงตัวอิมัลชันได้นานประมาณ 4 -6 วัน มากกว่า การทดสอบกับน้ำมันถั่วเหลือง ที่คงตัวได้นานประมาณ 2 วัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก L06 และ L07 คงตัวอิมัลชันได้น้อยกว่าแซนแทนกัมที่มีความคงตัวนาน 7 วัน

4.6.5 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 ปริมาณ 10–20 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer TGA 7 thermogravimetric analyzer ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.17 และ 4.18



รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L07 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส

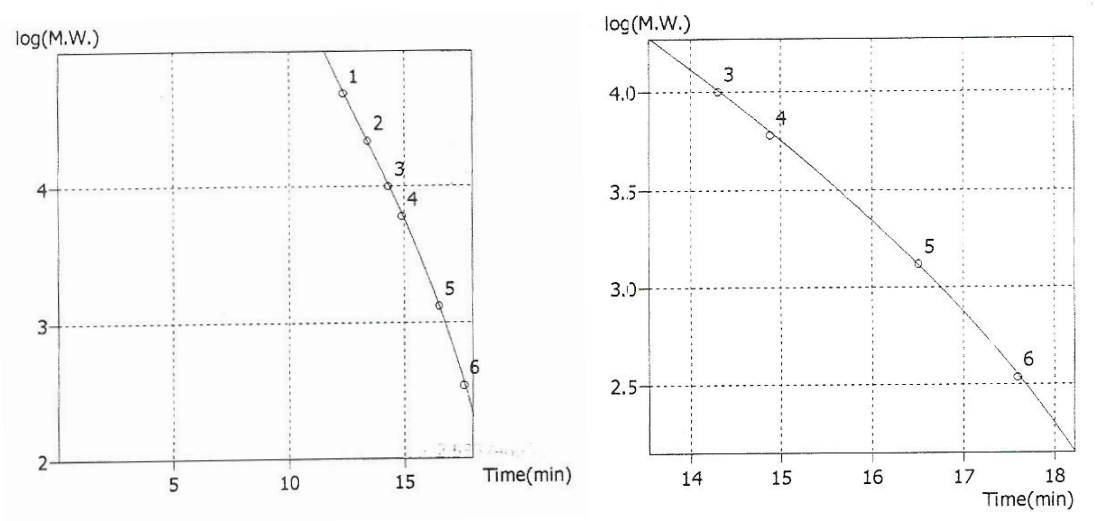
จากรูปที่ 4.15 พบว่า น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของ L06 เริ่มลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิประมาณ 225 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิย่อยสลายเท่ากับ 252.08 องศาเซลเซียส และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของ L06 ลดลง 60.01% จากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส และจากรูปที่ 4.16 พบว่า น้ำหนัก พอลิแซ็กคาไรด์ของ L07 เริ่มลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิประมาณ 250 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิย่อยสลาย (degradation temperature) เท่ากับ 271.20 องศาเซลเซียส และน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของ L07 ลดลง63.38% จากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพอลิแซ็กคาไรด์จาก L07 ทนความร้อนได้สูงกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก L06

4.6.6 น้ำหนักมวลโมเลกุล

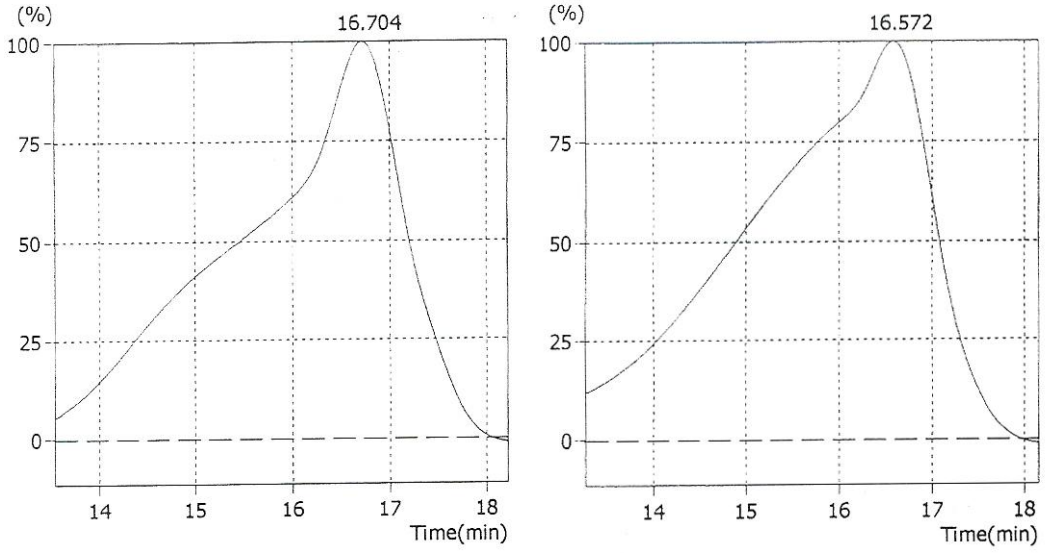
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลเฉลี่ยด้วยเครื่อง Gel permeation chromatography โดยใช้ภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับสารมาตรฐานพูลลูแลน ดังตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.17 ผลวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 แสดงดังรูปที่ 4.20

ตารางที่ 4.17 น้ำหนักมวลโมเลกุลและเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ของสารมาตรฐานพูลลูแลน

ลำดับ	เวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ (นาที)	น้ำหนักมวลโมเลกุล
1	12.332	48,800
2	13.400	21,700
3	14.305	10,000
4	14.884	6,000
5	16.507	1,320
6	17.594	342



รูปที่4.17 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพูลลูแลนที่น้ำหนักมวลโมเลกุลต่างๆ จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที
หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงลำดับการถูกชะออกจากคอลัมน์



(ก) (ข)

รูปที่ 4.18 โครมาโทแกรมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต (ก) L06 และ (ข) L07 จากเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี มีสารละลายตัวพาเป็นน้ำกลั่น อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.18 เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 กับ โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพูลลูแลน พบว่า

น้ำหนักมวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 เท่ากับ 2.8 $x10^3$ และ 3.3 $x10^3$ ดาลตัน ตามลำดับ

4.6.7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

นำพอลิแซกคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 ความเข้มข้น 0.5 และ 1 %โดยมวลต่อปริมาตร มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตามวิธีข้อที่ 3.3.8.7 ได้ผลดังตารางที่ 4.18 ดังนี้

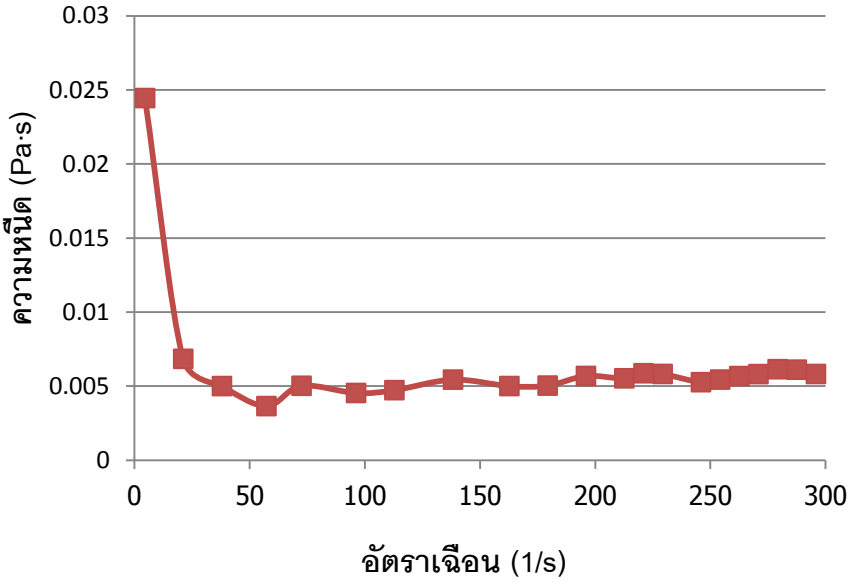
ตารางที่ 4.18 ค่า % DPPH radical scavenging activity ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06, L07 และแซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

พอลิแซ็กคาไรด์	DPPH radical scavenging activity (%)	
	ความเข้มข้น 0.5%w/v	ความเข้มข้น 1 %w/v
L06	9.92	10.83
L07	10.37	11.88
แซนแทนกัม	3.91	7.37
กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี)	97.79	98.09

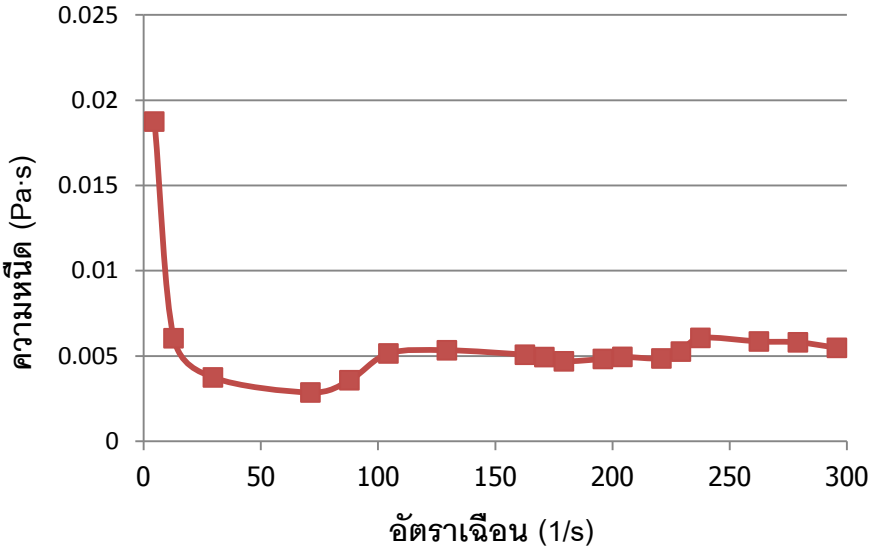
จากผลการทดลอง ตารางที่ 4.18 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มี% DPPH radical scavenging activity ที่ความเข้มข้น 1% %w/v สูงกว่าความเข้มข้นที่ 0.5% w/v โดยเท่ากับ 10.83% และ 11.88% ตามลำดับ จะเห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าแซนแทนกัม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก

4.6.8 การวัดความหนืด

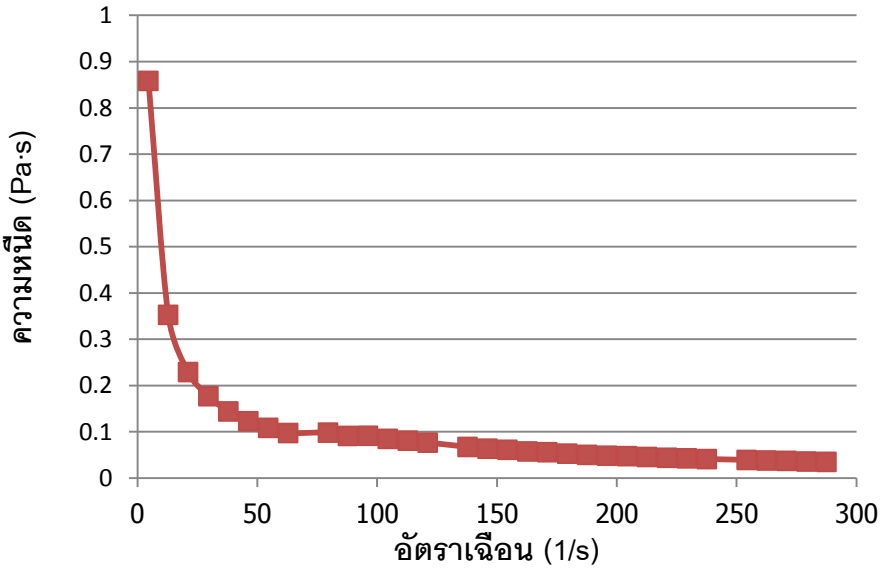
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยมวลต่อปริมาตร มาวัดความหนืดด้วยเครื่อง Rheometer Bohlin รุ่น C-VOR ที่อัตราเฉือนระหว่าง 0.05 -300 วินาที$^{-1}$ โดยนำมาเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ซึ่งผลแสดงดังรูปที่ 4.19 - 4.21



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.05–300 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06



รูปที่ 4.20 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.05–300 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L07



รูปที่ 4.21 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.05–300 วินาที$^{-1}$ของแซนแทนกัม

จากรูปที่ 4.19 – 4.21 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 L07 และแซนแทนกัม มีลักษณะกราฟที่มีแนวโน้มไปทางเดียวกันคือ เมื่อเพิ่มอัตราเฉือน ความหนืดจะลดลง แต่ L06 และ L07 อัตราเฉือนเพิ่ม ความหนืดช่วงท้ายจะค่อนข้างจะคงที่ ซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะของของไหลประเภท Non Newtonian fluid ชนิด Pseudoplastic ความหนืดสูงสุดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 เท่ากับ 24.45 mPa·s และ 18.74 mPa·s ที่อัตราเฉือน 4.566 วินาที$^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งค่าความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัม โดยแซนแทนกัมมีความหนืดสูงสุด เท่ากับ 858.54 mPa·s ที่อัตราเฉือน 4.566 วินาที$^{-1}$

4.7 การคัดเลือกสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในอาหาร

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีสมบัติที่คล้ายกันคือ มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ สามารถละลายน้ำได้ปานกลาง แต่ไอโซเลต L07 จะละลายน้ำได้ดีกว่า ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความหนืดต่ำ มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม ไม่มีความสามารถก่อให้เกิดเจล มีประจุเป็นกลาง มี

ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดี สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้ดี ทนความร้อนได้สูง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พฤติกรรมการไหลเป็นชนิด non-Newtonian pseudoplastic และ มีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียง คือ 2.8 x10^3 และ 3.3 x10^3 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสมบัติทั้งหมดแล้ว พบว่า สมบัติที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารได้ คือ ความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และความสามารถคงตัวอิมัลชัน เพราะ จากผลทดลอง แสดงให้เห็นว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้นานประมาณ 4- 5 วัน แต่ไม่เท่าแซนแทน ที่สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมมะกอกได้นาน 7 วัน ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้แซนแทนกัมเป็นส่วนมากในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และตัวก่อความคงตัวของอิมัลชันในอาหารต่างๆ เช่น น้ำสลัด เครื่องปรุงรส ผงซุปสำเร็จรูป และซอส (Sutherland, 1990) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ไปประยุกต์ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ และตัวก่อความคงตัวของอิมัลชันในน้ำสลัด เนื่องจาก น้ำสลัดเป็นอาหารอิมัลชันที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และ วิธีการตรวจสอบผลหลังนำไปประยุกต์ใช้ไม่ซับซ้อน

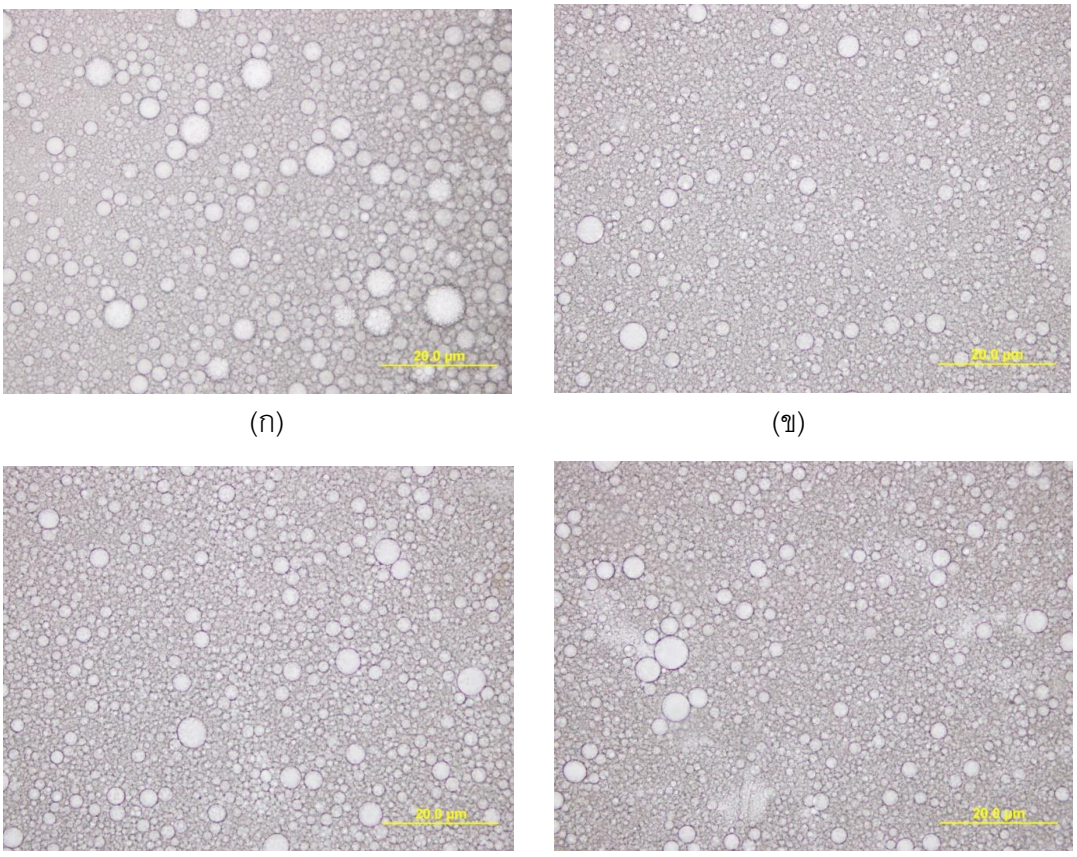
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ไปใช้ในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอก เนื่องจาก ผลการทดลองข้างต้น ข้อที่ 4.6.4 พบว่า สามารถคงตัวอิมัลชันในน้ำมันมะกอกได้ดีกว่าน้ำมันถั่วเหลือง และสามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้นานประมาณ 4- 5 วัน ขณะที่แซนแทนสามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้นาน 7 วัน ส่วนการพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่จะนำมาใช้ในน้ำสลัด ได้นำผลการทดลอง (ข้อที่ 4.6.4) ความคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5%w/v ในระยะเวลา 0-7 วัน (ตารางที่ 4.17) มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้วิธี ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 โดยเปรียบเทียบความแตกต่าง (Significant differences; $p < 0.05$) ของความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์ของ L06 L07 และแซนแทนกัม ด้วยวิธี Least Significant Different (LSD) โดยพบว่า %emulsifying activity ที่ความเข้ม 0.4% และ 0.5%w/v ของพอลิแซ็กคาไรด์ L06 L07 และแซนแทนกัม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$) (ภาคผนวก ช) ผู้วิจัยจึงได้เลือกความเข้มข้น 0.4 %w/v ของพอลิแซ็กคาไรด์ L06 L07 และแซนแทนกัมนำไปใช้ในน้ำสลัดต่อไป

4.8 การประยุกต์ในน้ำสลัด

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 0.4%w/v ใช้ในน้ำสลัดซึ่งมีส่วนผสมเป็นน้ำมันมะกอก โดยเตรียมน้ำสลัดให้เป็นอิมัลชันชนิดไขมันในน้ำ (oil in water emulsion) 50% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีข้อ 3.3.11.1 โดยใช้น้ำสลัดที่ไม่ได้ใส่พอลิแซ็กคาไรด์เป็นชุดควบคุม และใส่แซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.4%w/v เป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วตรวจสอบผลดังนี้

4.8.1 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และขนาดอนุภาคของอิมัลชัน

นำน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ (ชุดควบคุม) น้ำสลัดที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัม และน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภายหลังการเกิดอิมัลชัน 24 ชั่วโมง โดยแสดงดังรูปที่ 4.22



(ก) (ข)

(ค) (ง)

รูปที่ 4.22 ลักษณะอิมัลชันในน้ำสลัดที่ (ก) ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ และที่มี (ข) แซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต (ค) L06 และ (ง) L07 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า ภายหลังการเกิดอิมัลชัน 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้น วิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size distribution) ของอิมัลชันโดยใช้โปรแกรม Imagej และคำนวณค่า d_{32} (volume-surface mean diameters) ดังแสดงในตารางที่ 4.19

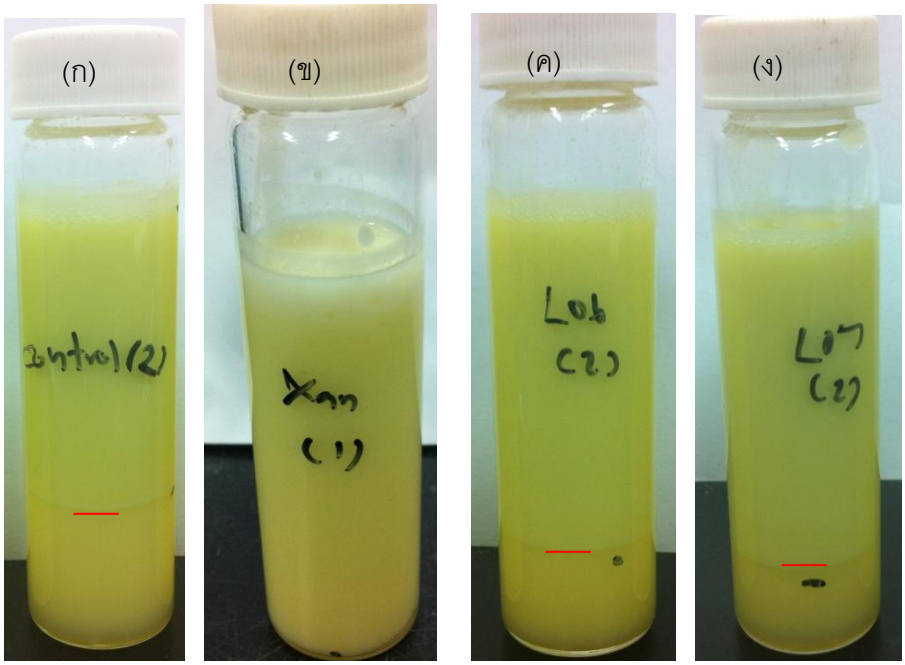
ตารางที่ 4.19 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (d_{32}; volume-surface mean diameters) ของอิมัลชันในน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ ในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07

น้ำสลัด	**ค่า d_{32} (volume-surface mean diameters)**
ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ (ชุดควบคุม)	3.21 μm
L06	2.44 μm
L07	2.92 μm
แซนแทนกัม	1.92 μm

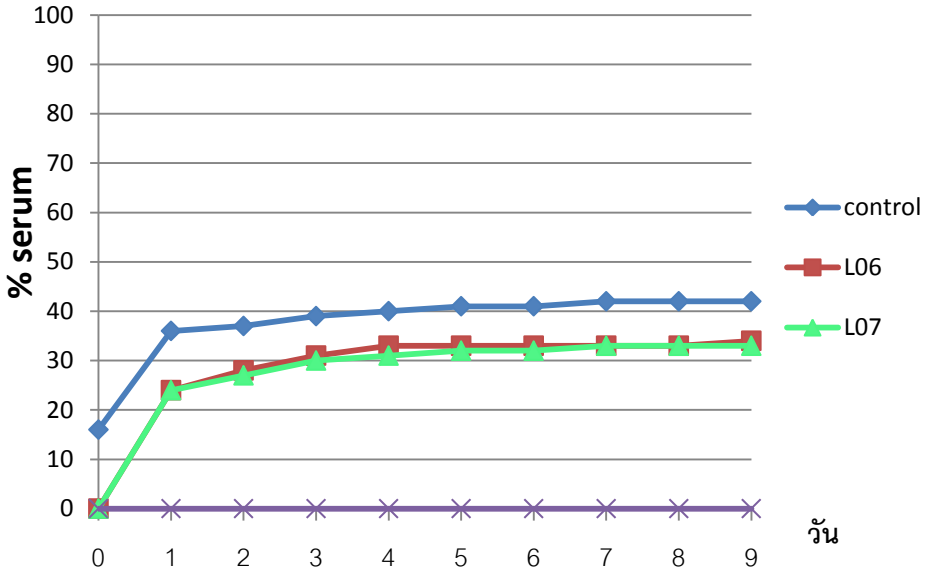
จากรูปที่ 4.21 และตารางที่ 4.19 พบว่า น้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีขนาดอิมัลชันหลากหลาย ไม่ค่อยสม่ำเสมอ โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย (d_{32}; volume-surface mean diameters) เท่ากับ 2.44 และ 2.92 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่พอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่พอลิแซ็กคาไรด์ มีขนาดอิมัลชันใหญ่กว่า ไม่สม่ำเสมอมากกว่าน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 โดยชุดควบคุมมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ 3.21 ไมโครเมตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสลัดที่มีแซนแทนกัม พบว่าน้ำสลัดที่มีแซนแทนกัม มีขนาดของอิมัลชันเล็กกว่าและค่อนข้างสม่ำเสมอมากกว่าน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ 1.92 ไมโครเมตร

4.8.2 ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability) ในน้ำสลัด

นำน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ (ชุดควบคุม) น้ำสลัดที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัม และน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร สูง 6 เซ็นติเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการแยกชั้นภายใน 9 วัน โดยความคงตัวของอิมัลชันจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อความสูงอิมัลชันทั้งหมด (%serum) ดังแสดงในรูปที่ 4.23 และ 4.24



รูปที่ 4.23 ความคงตัวของอิมัลชันของน้ำสลัดที่ (ก) ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ และที่มี (ข) แซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต (ค) L06 และ (ง) L07 ในวันที่ 1



รูปที่ 4.24 เปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อความสูงอิมัลชันทั้งหมด (%serum) ของน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ น้ำสลัดที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัม และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 9

จากผลการทดลอง พบว่า น้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 เกิดการแยกชั้นในวันที่ 1 หลังจากวันที่ 1 จนถึง 9 วัน น้ำสลัดแยกชั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสลัดที่ไม่มีพอลิแซ็กคาไรด์ (ชุดควบคุม) พบว่าน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 แยกชั้นน้อยกว่า (มี% serum ต่ำกว่า) ชุดควบคุม โดยชุดควบคุมแยกชั้นในวันที่ 0 ประมาณ 2 ชั่วโมงหลังจากเตรียมน้ำสลัด ส่วนน้ำสลัดที่มีแซนแทนกัม พบว่า ไม่พบการแยกชั้นในระหว่างวันที่ 0 – 9 วัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในอาหาร สิ่งแรกที่ต้องคำนึงถึงคือ ความปลอดภัยที่สามารถนำไปใช้ในอาหารได้จริง โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ และมีความปลอดภัยในการบริโภค ก็คือ แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งจัดเป็น Food-Grade Bacteria และได้รับการรับรองว่าเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) (Mogensen และคณะ, 2002) งานวิจัยนี้จึงได้คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ปกติแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถคัดแยกได้จากธรรมชาติ เช่น ผลิตภัณฑ์นม อาหารพื้นเมือง และอาหารหมักต่างๆ (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005; Mozzi และคณะ, 2006) จึงได้เก็บตัวอย่างผักดองชนิดต่างๆในประเทศไทย ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง และมะนาวดอง และคัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS และ คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้บนอาหารแข็ง MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า ได้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด 8 ไอโซเลต จากตัวอย่างหน่อไม้ดองที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดนครปฐม โดยให้รหัสเชื้อเป็น L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 และ L08 จากนั้นนำไอโซเลตทั้งหมดมาศึกษาสัณฐานวิทยาและทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น เพื่อตรวจสอบว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจริง พบว่า ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง และให้ผลแคทาเลสเป็นลบ จึงจัดว่าเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย อ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994; Kandler และ Weiss, 1986)

เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้มาทำการผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ไอโซเลต L06 และ L07 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ 11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้มากกว่าที่ Smitinont และคณะ (1999) รายงานไว้ว่า *Pediococcus pentasaceus* สายพันธุ์ AP-1 และ AP-3 ซึ่งคัดแยกได้จากแหนมในประเทศไทย สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 6.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ Ruas-Madiedo และคณะ (2009)

รายงานไว้ว่า *Lactobacillus reuteri* LB121 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงถึง 10 กรัมต่อลิตร โดยประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน) ภาวะในการเจริญ และเวลาในการบ่ม (Degeest และคณะ, 2001) จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติม โดยเลือกไอโซเลต L07 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มี 4% ของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส แลคโตส และ มอลโทส (ภาคผนวก จ) พบว่า น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด เหตุผลที่แบคทีเรียใช้น้ำตาลซูโครส แล้วให้พอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดนั้นสืบเนื่องมาจาก เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ จะต้องใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้นจำเพาะเท่านั้น (Werning และคณะ, 2006) และเมื่อแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส ตั้งแต่ 0% - 12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก จ) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ก็สูงขึ้นเช่นกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสให้สูงขึ้นออกไปที่ 18% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ก็ยังพบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ก็ยังสูงขึ้นอีกดังนั้นความเข้มข้นนี้ก็ยังไม่ใช่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิเมอร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้ควรศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไปในอนาคต ไอโซเลต L07 นี้ที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูงถึง 18% ก็ยังผลิตพอลิเมอร์ได้สูงขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียนี้น่าจะสามารถทนต่อแรงดันออสโมติกได้ดี ดังนั้นไอโซเลต L07 มีประสิทธิภาพในการผลิตได้สูง จะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย เวลา และแรงงานที่เหมาะสมกับการใช้งานในระดับอุตสาหกรรม

สมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสิ่งที่มีบทบาทต่อการเลือกใช้งานของพอลิเมอร์ จากการที่พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีสมบัติที่แตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่แตกต่างกันได้หลายรูปแบบขึ้นกับสมบัติเฉพาะของพอลิแซ็กคาไรด์นั้นๆ ในอุตสาหกรรรมอาหาร พอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปใช้งานได้หลายลักษณะ เช่น สารเพิ่มความข้นหนืด สารก่ออิมัลชั่น สารก่อเจล และสารเพิ่มความคงตัว เป็นต้น (Laws และ Marshall, 2001; Ruas-Madiedo และคณะ, 2002) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลต เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกไอโซเลตที่เหมาะสมไปศึกษาต่อ และเป็นข้อมูลสมบัติเบื้องต้นเพื่อพิจารณาในการนำไปประยุกต์ในอาหาร จากการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) พบว่า ทั้ง 8 ไอโซเลตมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคสทั้งหมด ซึ่งจัดว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเรียกว่า กลูแคน มีแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์รายงานไว้เช่นกัน ซึ่งรายงานโดย Paulo และ

คณะ (2011) ว่า *Leuconostoc pseudomesenteroides* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคส ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายเดกซ์แทรน และ Korakli และ Vogel (2006) รายงานว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตกลูแคน พบในกลุ่มของ *Leuconostoc Lactobacillus* และ *Weissella* โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น องค์ประกอบน้ำตาล การแทนที่ของสาร และลักษณะโครงสร้างแบบเส้นตรงหรือแตกกิ่ง มีความสำคัญต่อสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ (Bohn และ BeMiller, 1995; Kennedy และ White, 1983; Kennedy, 1989) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 8 ไอโซเลตอยู่ในช่วงที่สูงคือ 65-99 % โดยน้ำหนัก และมีปริมาณโปรตีนต่ำ โดยอยู่ในช่วง 0.15- 3.95% โดยน้ำหนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ค่อนข้างบริสุทธิ์ซึ่งให้ผลที่ดีกว่า Smitinont และคณะ(1999) ที่พบว่า *Pediococcus pentasaceus* สายพันธุ์ AP-1 และ AP-3 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เท่ากับ 90.3% และ 85.2% โดยน้ำหนัก และมีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 1.0% และ 4.0% ตามลำดับ

จากการทดสอบความสามารถในการละลายที่อุณหภูมิห้อง พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L01 – L08 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ละลายน้ำได้ปานกลาง ยกเว้น ไอโซเลต L07 ละลายน้ำได้ดี และทั้งหมดไม่ละลายในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล เมื่อนำมาละลายในน้ำ พบว่า ให้ความหนืดต่ำเมื่อเทียบกับแซนแทนกัม สมบัติการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์สามารถทำให้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้กว้างขวาง และลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ให้ความหนืดต่ำ สามารถนำไปประยุกต์กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความหนืดต่ำ เช่นในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและเครื่องสำอาง (De Vuyst และ Degeest, 1999) จากการรายงานของ Vijayendra และคณะ (2008) พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Leuconostoc* sp. CFR 2181 มีสมบัติการละลายน้ำได้ดี และให้ความหนืดต่ำ ความสามารถในการละลายน้ำนั้นขึ้นอยู่กับการมีหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ และการที่พอลิแซ็กคาไรด์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจาก เมื่อละลายในตัวละลายอินทรีย์ ทำให้จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดการตกผลึกของพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวทำละลายอินทรีย์ (Jame, 1986) นอกจากนี้ในภายหลังได้เลือกไอโซเลต L06 ไปศึกษาต่อ จึงได้ลองทำการละลายพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้ความร้อน พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ L06 สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไป แต่ไม่ได้แสดงผลนี้ไว้ในผลการทดลอง

ในการทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L01 – L08 มีความสามารถในการอุ้มน้ำที่ต่ำเมื่อเทียบกับแซนแทนกัม คาราจีแนน และกัวกัม โดยมีค่าเท่ากับ 71.41, 73.82, 68.30, 67.62, 82.85, 87.29, 80.91 และ 73.26 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างชัดเจนกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้เปรียบเทียบ โดยไอโซเลต L04 สามารถอุ้มน้ำได้สูงสุด แต่เมื่อเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าที่ทดสอบยังถือว่ามีความสามารถในอุ้มน้ำต่ำ สมบัติความสามารถในการอุ้มน้ำ สามารถนำไปประยุกต์ในอาหารได้หลากหลาย เช่น ช่วยลดการสูญเสียน้ำในโยเกิร์ต คีเฟอร์ และนมหมัก เป็นต้น (Farnworth และคณะ, 2006) โดยความสามารถในการอุ้มน้ำนั้นมีความสัมพันธ์กับสมบัติการไหล (Sánchez และคณะ, 1995)

ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์เป็นสมบัติที่ถูกนำไปใช้อย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารและยา พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมได้แก่ แซนแทนกัม และกัวกัม (Freitas และคณะ, 2009) จากการทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 8 ไอโซเลตเมื่อเทียบกับแซนแทนกัม พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยมวลต่อปริมาตร มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันมะกอกได้ไม่แตกต่างกับแซนแทนกัมอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 8 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันกับน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันมะกอกได้ดีเท่าแซนแทนกัม มีรายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205 ที่ความเข้มข้ม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %emulsifying activity สูงสุดกับน้ำมันเมล็ดทานตะวันเท่ากับ 78.2% ซึ่งสูงกว่าแซนแทนกัมและกัวกัม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 69.5% และ 65.7% ตามลำดับ (Prasanna และคณะ, 2012)

จากการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 8 ไอโซเลต พบว่า มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูง มีปริมาณโปรตีนต่ำ ละลายน้ำได้ปานกลาง ยกเว้น พอลิแซ็กคาไรด์จาก L07 ที่ละลายน้ำได้ดี ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความหนืดต่ำ มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ และมีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม จากสมบัติทั้งหมดจะเห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 8 ไอโซเลตมีสมบัติที่ใกล้เคียงกัน จึงได้พิจารณาประสิทธิภาพในการผลิต เพราะประสิทธิภาพในการผลิตก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกไปประยุกต์ต่อ จึงได้เลือก ไอโซเลต L06 และ L07 ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ

11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานและนำไปทดสอบสมบัติอื่นๆเพิ่มเติมต่อไป โดยสองไอโซเลตแตกต่างกันที่ความสามารถในการละลายน้ำ ถ้าพิจารณาถึงสมบัติทั้งหมดที่ศึกษาไป พบว่าสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์น่าจะเป็นสมบัติที่เหมาะสมต่อการไปประยุกต์ในอาหาร แต่ก็ต้องศึกษาสมบัติเพิ่มเติม เพื่อประกอบการพิจารณาในการนำไปประยุกต์ในอาหารต่อไป

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย โดยศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่า ไอโซเลต L06 และ L07 ไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไม่เจริญบนอาหารแข็ง MacConkey ไม่เคลื่อนที่ และการทดสอบปฏิกิริยาใน Triple Sugar Iron (TSI) พบว่า ให้แก๊สและกรด แต่ไม่เกิดแก๊ส H2S จากผลทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด จึงจัดว่า ไอโซเลต L06 และ L07 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ตามอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt และคณะ, 1994; Kandler และ Weiss, 1986) นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L06 และ L07 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Weissella confusa* และ *Weissella cibaria* 99% เช่นกัน จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองไอโซเลตมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L06 และ L07 มีความคล้ายกัน 99 % (ภาคผนวก ซ) สรุปว่าทั้งสองไอโซเลตเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน และจัดว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Weissella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเซลล์แท่งและกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative ในกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Shukla และGoyal 2011) ซึ่งแยกออกมาจากกลุ่ม *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6.5% (Axelsson, 2004) สามารถผลิตเดกซ์แทรนได้โดยใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสซึ่งใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยทั่วไป *Weissella* จะถูกคัดแยกได้จากอาหารหมัก (Bjorkroth และคณะ, 2002; Kang และคณะ, 2006) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่พบในอาหารหมักพื้นเมืองส่วนมากพบว่าเป็น *Weissella* sp. (Paludan-Muller และคณะ, 1999) และพบว่าโดยทั่วไปพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella* sp. เป็นชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์โดยมีซูโครสเป็นสารตั้งต้น (Tayuan และคณะ, 2011) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าตรงกับข้อมูลของไอโซเลต L06 และ L07 ก็คือ แบคทีเรียทั้งสองถูกคัดแยกได้จากอาหารหมัก (หน่อไม้ดอง) และ

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นชนิดฮอมอพอลิเมอร์ซึ่งใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ในปัจจุบันการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียในสกุล *Weissella* ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยมีงานวิจัยและการรายงานต่างๆมากมาย ตัวอย่างเช่น Wongsuphachat และคณะ (2010) รายงานว่า คัดแยก *Weissella confusa* NH 02 ได้จากไส้กรอกอีสานในประเทศไทย โดยมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถผลิตได้ 18.08 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง Amari และคณะ (2012) รานงายว่า คัดแยก *Weissella confusa* และ *Weissella cibaria* ได้จาก sourdough ซึ่งสามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีโครงสร้างมสายตรงเชื่อมกันด้วยพันธะชนิด α-(1,6) และ α-(1,3) และ Rao และ Goyal (2012) รายงานว่า คัดแยก *Weissella cibaria* JAG8 ได้จากแอปเปิ้ล และสกัดแยกเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส นำไปใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนพบว่า สามารถผลิตเดกซ์แทรนได้ 38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีหลายงานวิจัย ได้รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella* sp. สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ โดย Kim และคณะ (2008) รายงายงานว่า β-กลูแคน ที่ผลิตจาก *Weissella hellenica* SKkimchi3 ซึ่งคัดแยกได้จากกิมจิ สามารถพัฒนาเป็นสารเติมแต่งอาหารได้อย่างปลอดภัย และ *Weissella confusa* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรน สามารถนำไปใช้ประยุกต์ใน sourdough โดยปรับปรุงเนื้อสัมผัสและคุณภาพของขนมปัง (Katina และคณะ, 2009)

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 โดยทดสอบความสามารถในการก่อเจลกับเกลือของโลหะ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 ไม่สามารถเกิดเจลในขณะที่แซนแทนกัมสามารถเกิดเจลได้กับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ทั้งนี้การก่อเจลเกิดจากการจับกันระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์และไอออนของเกลือ และขึ้นกับโครงสร้าง ชนิดประจุ ปริมาณประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ ความสามารถในการเข้าถึงและการจับอย่างจำเพาะระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์และไอออนเกลือของโลหะ (Sutherland, 1994) เนื่องจากประจุมีความสำคัญต่อการก่อเจลจึงได้ทำการทดสอบประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 มีประจุสุทธิเป็นกลาง จึงเป็นคำอธิบายการไม่ก่อเจลหลังจับกับเกลือของโลหะ

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 กับกัวกัมที่เป็นชุดควบคุม พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตจาก L06 และ L07 มีค่ากิจกรรมก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์ไม่แตกต่างกับกัวกัมอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 มีค่ากิจกรรมก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมต์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเท่ากับ 75.64% และลดลงที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นตั้งแต่ 0.4 -1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L07 มีค่ากิจกรรมก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 69.08% และลดลงที่ความเข้มข้น 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกัวกัมมีค่ากิจกรรมก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเท่ากับ 68.51% Wang และคณะ (2008) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 มีค่ากิจกรรมก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลดลงที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับ L07 Kanmani และคณะ (2011) รายงานว่า *Streptococcus phocae* PI80 มีค่ากิจกรรมก่อการจับกลุ่มกับผงถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 0.2 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 86.4% ทั้งนี้กลไกการเกิดก่อการจับกลุ่มมีดังนี้คือ กิจกรรมก่อการจับกลุ่มจะถูกกระตุ้นโดยไอออนบวก (Ca^{2+}) โดย Ca^{2+}จะจับกับหมู่ฟังก์ชันนอลที่เป็นประจุลบของพอลิแซ็กคาไรด์ และสร้างสะพานระหว่างอนุภาคแขวนลอยกับพอลิแซ็กคาไรด์ (Yu และคณะ, 2009) การสร้างสะพานทำให้พอลิแซ็กคาไรด์สามารถดูดซับบนผิวของอนุภาคแขวนลอย ทำให้เกิดกิจกรรมการตกตะกอน แต่อย่างไรก็ตามการมีพอลิแซ็กคาไรด์ที่มากเกินไป ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ดูดซับบนผิวอนุภาคจนไม่มีที่ว่างเหลือแก่การสร้างสะพานระหว่างอนุภาคแขวนลอย ดังนั้นที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงขึ้น จะทำให้กิจกรรมก่อการจับกลุ่มลดลง นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันนอลที่เป็นประจุลบจำนวนมาก เช่น หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ไฮดรอกซิล เป็นต้น จะทำให้มีบริเวณจับกับ Ca^{2+}มาก (Li และคณะ, 2008) ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม สามารถนำไปประยุกต์ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ และอาหารหมักในช่วงกระบวนการปลายน้ำ (downstream processing) โดยช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์ในกระบวนการหมัก (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001)

ความคงตัวของอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นการทดลองที่เพิ่มเติมต่อจากการทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ โดยได้แปรผันความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 0.1 - 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการทดลองกับน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันมะกอก และติดตามความคงตัวของอิมัลชันในวันที่ 0 -7 โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม พบว่า ความคงตัวของอิมัลชันกับน้ำมันถั่วเหลืองของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 0.5% ดีที่สุด สามารถคงตัวได้นาน 2 และ 4 วัน ตามลำดับ ส่วนความคงตัวของอิมัลชันของแซนแทนกัมกับน้ำมันถั่วเหลืองดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5% คงตัวอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 7 วัน จะเห็นว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันถั่วเหลืองได้ต่ำกว่าแซนแทนกัม ความคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอก พบว่า ความคงตัวของอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และL07 ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.5% สามารถคงตัวได้นาน 4 และ 5 วัน ตามลำดับ ส่วนความคงตัวของอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกของแซนแทนกัมดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.5% สามารถคงตัวได้นาน 7 วัน จะเห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันถั่วเหลืองได้ต่ำกว่าแซนแทน และความคงตัวอิมัลชันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และL07 กับน้ำมันมะกอกได้นานกว่าน้ำมันถั่วเหลือง จากผลการทดลองจะเห็นว่าความเข้มข้นที่แตกต่างของพอลิแซ็กคาไรด์ไม่มีผลต่อความสามารถก่ออิมัลชัน เพราะ ค่า %Emulsifying activity ของแต่ละความเข้มข้นมีค่าใกล้เคียงกันในวันที่ 0 แต่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์มีผลต่อความคงตัวอิมัลชันในระยะเวลาที่นานขึ้น Prasanna และคณะ (2012) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันเมล็ดทานตะวัน ได้นาน 7 วัน โดยลดลงจาก 78.2% ในวันที่ 1 เป็น 77.4% ในวันที่ 7 การคงตัวของอิมัลชันนั้นมีความสามารถต่างๆกันไป โดยจะมีความสามารถในการคงตัวอิมัลชันได้น้อยหรือมากขึ้นกับน้ำมันและสารอิมัลซิไฟเออร์ น้ำมันมีผลต่อความเสถียรของอิมัลชัน โดยขึ้นกับชนิดของน้ำมัน ลักษณะโครงสร้างโมเลกุล และการจัดเรียงของโครงสร้าง (จำนวนอะตอมคาร์บอน จำนวนพันธะคู่ และการแตกกิ่ง) สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมัน (น้ำหนักมวลโมเลกุล จุดหลอมเหลว ความหนืด และแรงตึงผิว เป็นต้น) ส่วนสารอิมัลซิไฟเออร์ เป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยรักษาอิมัลชันให้คงที่ โดยขึ้นกับลักษณะโครงสร้าง (น้ำหนักมวลโมเลกุล คอนฟอร์เมชัน ความยืดหยุ่น และความเป็นขั้ว) และสมบัติทางกายภาพและเคมี (การละลาย แรงตึงผิว ความหนืด และการก่อเจล) ความสามารถในการคงตัวอิมัลชัน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร เช่น อาหารอิมัลชัน และเครื่องดื่มต่างๆ (McClements, 2004)

ในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องใส่สารเติมแต่งที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์บางอุตสาหกรรมอาหารมีกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความร้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาสมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยได้วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA) พบว่า น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของ L06 ลดลง 60.01% โดยเริ่มลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ 30 - 600 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่มีการสลายตัวสูงสุด เท่ากับ 252.08 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ของ L07 ลดลง 63.38% โดยเริ่มลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ 30-600 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่มีการสลายตัวสูงสุด เท่ากับ 271.10 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน สรุปได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก L06 และ L07 สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูง และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีกระบวนการที่ใช้ความร้อนได้ Wang และคณะ (2010) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* KF5 มีอุณหภูมิย่อยสลาย (degradation temperature) เท่ากับ 279.59 องศาเซลเซียส แซนแทนกัมมีอุณหภูมิย่อยสลายเท่ากับ 282.65 องศาเซลเซียส และ โลคัสบีน มีอุณหภูมิย่อยสลาย เท่ากับ 278.46 องศาเซลเซียส สมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ กระบวนการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จะประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้ 1) การทำลายการดูดซับของน้ำกับพอลิแซ็กคาไรด์ 2) การกำจัดโมเลกุลของน้ำ 3) การย่อยสลายพอลิเมอร์ โดยการแตกพันธะ C–O และ C–C ในวงแหวนน้ำตาล ทำให้เกิด CO, CO_2 และ H_2O 4) การเกิดโครงสร้างของ polynuclear aromatic และ graphitic carbon (Fried, 2000; Zamora และคณะ, 2002)

จากการวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลเฉลี่ยด้วย Gel permeation chromatography พบว่า น้ำหนักมวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 เท่ากับ 2.8 $x10^3$ และ 3.3 $x10^3$ ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งพบว่าทั้งสองมีน้ำหนักมวลโมเลกุลไม่ค่อยสูงมาก โดยปกติฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จะมีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูงถึง 10^6 ดาลตัล (Monsan และคณะ, 2001; Korakli และ Vogel, 2006) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีน้ำหนักมวลโมเลกุลต่ำ อาจเป็นเพราะ เกิดการสูญเสียน้ำหนักมวลโมเลกุลในขั้นตอนการทำแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ (Farnworth และคณะ, 2006) จากการที่พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองมีน้ำหนักมวลโมเลกุลไม่สูงมาก เพราะเหตุนี้จึงทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 มีความหนืดต่ำ ซึ่ง Freitas และคณะ(2009) รายงานไว้ว่า ความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์จะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างและน้ำหนักมวลโมเลกุล หากน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง ความหนืดก็จะ

สูง หากน้ำหนักมวลโมเลกุลต่ำ ความหนืดก็จะต่ำ ส่วนการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มี %DPPH radical scavenging activity สูงที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยเท่ากับ 10.83% และ 11.88% ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น ก็ส่งผลให้มี %DPPH radical scavenging activity สูงขึ้น โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าแซนแทนกัม (7.37%) แต่ต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) (98.09%) ที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Kanmani และคณะ (2011) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Streptococcus phocae* PI80 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แต่ต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร

เมื่อวัดความหนืดที่อัตราเฉือนระหว่าง 0.05 – 300 วินาที$^{-1}$ พบว่า ความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และ L07 จะลดลง เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น โดยลักษณะนี้เป็นลักษณะพฤติกรรมการไหลประเภท Non Newtonian fluid ชนิด Pseudoplastic ลักษณะพฤติกรรมการไหลประเภท Non Newtonian fluid เป็นพฤติกรรมการไหลที่มีค่าความหนืดไม่คงที่ โดยขึ้นอยู่กับอัตราเฉือน สามารถแบ่งออกเป็นหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือ Pseudoplastic ซึ่งเป็นของไหลที่มีความหนืดลดลง เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น (Farid, 2010) โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L06 และL07 มีพฤติกรรมการไหลเหมือนกันกับแซนแทนกัม และเช่นเดียวกับการรายงานของและ Rao และ Goyal (2012) ซึ่งรายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella cibaria* JAG8 ก็เป็น Non Newtonian fluid ชนิด Pseudoplastic และจากลักษณะสมบัติการไหลแบบ Non Newtonian pseudoplastic สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นสารก่อเจล สารเพิ่มความข้นหนืด และสารเพิ่มความคงตัว (Feddersen และ Thorp, 1993)

สรุปสมบัติทางเคมีและกายภาพทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ดังนี้ มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ สามารถละลายน้ำได้ปานกลาง แต่ไอโซเลต L07 จะละลายน้ำได้ดีกว่า ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความหนืดต่ำ มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเท่าแซนแทนกัม ไม่มีความสามารถก่อให้เกิดเจล มีประจุเป็นกลาง มีความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดี สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้ดี ทนความร้อนได้สูง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พฤติกรรมการไหลเป็นชนิด non-

Newtonian pseudoplastic และมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียง คือ 2.8 x10^3 และ 3.3 x10^3 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองมีสมบัติที่ใกล้เคียงกันมาก อาจเนื่องมาจากเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสกุล *Weissella* เหมือนกัน ถ้าพิจารณาสมบัติทางกายภาพที่มีสมบัติที่ดีและสามารถนำไปประยุกต์ได้ในอาหาร ได้แก่ ความสามารถในการละลายน้ำ ความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ความสามารถในการคงตัวอิมัลชัน ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดี ความสามารถทนความร้อนได้สูง และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการละลายน้ำเป็นสมบัติหนึ่งที่สำคัญ เพราะส่วนใหญ่อาหารมีน้ำเป็นส่วนประกอบ เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปใช้ในอาหารก็ต้องสามารถละลายในน้ำได้ หากละลายยากหรือไม่ละลาย ก็อาจจะตกตะกอนในอาหาร ทำให้ลักษณะอาหารเปลี่ยนไป ความสามารถทนความร้อนได้สูงเป็นสมบัติทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปใช้ในกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงได้ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ก็เป็นสมบัติเสริมอย่างหนึ่ง เพราะสามารถนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร ไม่ว่าจะนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปใช้ประโยชน์ในด้านสมบัติอื่นๆ ก็จะได้สมบัติในการเป็นสารออกซิแดนซ์ไปด้วย ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่มได้ดี สามารถนำไปประยุกต์ในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม ช่วยตกตะกอนอนุภาคต่างๆทำให้น้ำใสขึ้น กระบวนการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ และอาหารหมักในช่วงกระบวนการปลายน้ำ (downstream processing) โดยช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์ในกระบวนการหมัก (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) ส่วนความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน สามารถไปประยุกต์ในอาหารอิมัลชัน เช่น น้ำสลัด มายองเนส เครื่องปรุงรส ซอส นม และไอศกรีม เป็นต้น (McClements, 2004) เพื่อช่วยในการก่ออิมัลชัน และรักษาให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันในระยะเวลาที่นานขึ้น จากสมบัติทางกายภาพทั้งหมดที่เลือกมาพิจารณา พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ในในอาหารอิมัลชัน เนื่องด้วยสมบัติความสามารถในเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และความสามารถในการคงตัวอิมัลชัน ส่วนสมบัติอื่นๆ ก็มีประโยชน์ในการประยุกต์ในอาหารอิมัลชัน ก็คือ ความสามารถในการละลายน้ำ พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองสามารถละลายน้ำ ทำให้ง่ายและสะดวกต่อการใช้ในอาหารอิมัลชัน ความสามารถทนความร้อน สามารถนำไปใช้กับอาหารอิมัลชันที่ต้องผ่านกระบวนการความร้อนสูง เช่น กระบวนการพาสเจอไรซ์เซชัน และ กระบวนการสเตอริไลซ์เซชัน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นประโยชน์เสริมเพิ่มเติมจากสมบัติความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ทำให้อาหารอิมัลชันมีประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงได้เลือกนำไปประยุกต์ในอาหารอิมัลชัน โดยได้เลือกประยุกต์ในน้ำสลัด เพราะเป็นอาหารอิมัลชันพื้นฐาน ที่ทำได้ง่าย ส่วนประกอบหาได้ไม่ยาก และวิธีการตรวจสอบผลหลังนำไปประยุกต์ใช้ไม่ซับซ้อน โดยนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ไปใช้ในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอก เพราะ จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า สามารถคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้ดี และใช้ความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพราะจากการคำนวณค่าสถิติจากความเข้มข้น 0.1 -0.5 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ทดสอบความคงตัวอิมัลชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 L07 และแซนแทนกัม พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่า %emulsifying activity ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$) จึงได้เลือกความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากการติดตามผลหลังนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไปใช้ในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอก มีผลดังนี้ เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคำนวณขนาดอนุภาคของอิมัลชัน ภายหลังการเกิดอิมัลชัน 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีขนาดอิมัลชันหลากหลาย ไม่ค่อยสม่ำเสมอ โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย (d_{32}; volume-surface mean diameters) เท่ากับ 2.44 และ 2.92 ไมโครเมตร ตามลำดับ ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่พอลิแซ็กคาไรด์ มีขนาดอิมัลชันใหญ่กว่าไม่สม่ำเสมอมากกว่าน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 3.21 ไมโครเมตร น้ำสลัดที่มีแซนแทนกัม มีขนาดของอิมัลชันเล็กกว่าและค่อนข้างสม่ำเสมอมากกว่าน้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 1.92 ไมโครเมตร Horozov และคณะ (2007) รายงานไว้ว่า ขนาดของอนุภาคเล็ก แสดงถึงความเสถียร หรือมีความคงตัวอิมัลชันดี ยิ่งมีอนุภาคขนาดเล็ก ก็ยิ่งมีความคงตัวของอิมัลชันได้ดีมากขึ้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มีประสิทธิภาพในการรักษาความคงตัวอิมัลชันได้ดี โดยป้องกันไม่ให้อนุภาคน้ำมันรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้น จึงมีขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กกว่าชุดควบคุม แต่ยังมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าแซนแทนกัมที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กกว่า

จากการทดสอบความคงตัวของอิมัลชันในน้ำสลัด พบว่า น้ำสลัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 เกิดการแยกชั้นในวันที่ 1 ส่วนชุดควบคุมแยกชั้นในวันที่ 0 ประมาณ 2 ชั่วโมงหลังจากเตรียมน้ำสลัด โดยลักษณะการแยกชั้นเป็นลักษณะการไม่คงอิมัลชันแบบ creaming คือ วัฏภาคภายใน (หยดน้ำมัน) เคลื่อนที่ขึ้นข้างบน และน้ำสลัดที่มีแซนแทนกัม ไม่พบการแยกชั้นในระหว่างวันที่ 0 – 9 วัน สาเหตุที่ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 สามารถคงตัวอิมัลชันได้ระยะสั้นกว่า แซนแทนกัม เนื่องมากจาก มีความหนืดต่ำมากเมื่อเทียบกับแซนแทนกัม Mcclements (2004) ได้อธิบายไว้ว่า กลไกการทำงานที่ทำให้อิมัลชันคงตัวอยู่ได้นานมีอยู่ 2 ประเภท คือ 1) ความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ที่สามารถดูดซับบนอนุภาคน้ำมัน เนื่องมาจากความเป็น surface-active molecule ทำให้ป้องกันไม่ให้อนุภาคน้ำมันรวมตัวกันได้ Dickinson (2003) รายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดมีโครงสร้างตรงสายหลักเป็นส่วนมีขั้ว และเส้นกิ่งเป็นส่วนไม่มีขั้ว จึงทำให้สามารถดูดซับบนอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันได้ และ 2) ความสามารถในการเปลี่ยนเนื้อสัมผัสของวัฏภาคภายนอก หรือ น้ำ เช่น ความสามารถในการเพิ่มความข้นหนืด ทำให้อนุภาคน้ำมันเคลื่อนที่ได้ยากและช้าขึ้น จึงทำให้ป้องกันการรวมตัวของอนุภาคน้ำมัน จากสาเหตุนี้ ทำให้แซนแทนกัม สามารถคงตัวอิมัลชันได้นานกว่า เพราะมีกลไกการทำงานทั้งสองประเภท ซึ่งต่างกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ที่มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ แต่มีความหนืดต่ำ จึงทำให้คงอิมัลชันได้ระยะสั้นกว่า

ถึงแม้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 จะมีประสิทธิภาพในการคงตัวอิมัลชันได้ต่ำกว่าแซนแทนกัม แต่อย่างไรก็ตามพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ก็มีสมบัติที่ดีอื่นๆ ต่อการประยุกต์ในน้ำสลัด จากการที่พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองให้ความหนืดต่ำ จึงสามารถนำไปใช้กับน้ำสลัดที่ไม่ต้องการความข้นหนืดมาก ในน้ำสลัดประเภท Pourable ที่สามารถเทออกจากภาชนะได้ง่าย ซึ่งแตกต่างจากแซนแทนกัมที่ให้ความหนืดสูง เมื่อนำไปใช้กับน้ำสลัด จะทำให้น้ำสลัดมีความข้นหนืดมาก ส่วนสมบัติความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสอง สามารถป้องกันการเหม็นหืนที่เกิดขึ้นในน้ำสลัดได้ เนื่องจาก น้ำสลัดมีส่วนประกอบเป็นน้ำมัน หากสัมผัสกับอากาศ อาจทำให้เกิดกลิ่นหืนได้ ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 ก็จะช่วยลดปัญหานี้ได้ ถึงแม้จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ แต่ผู้บริโภคก็จะได้ประโยชน์จากสมบัติทางหน้าที่ส่วนนี้ด้วย นอกจากนี้สมบัติในการทนความร้อนได้สูง ก็สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์นี้ไปใช้กับอาหารอิมัลชันต่างๆ ที่ต้องผ่านกระบวนการความร้อนสูงได้

นอกจากนี้มีหลายงานวิจัย รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแล็กติกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Weissella* sp. สามารถปรับปรุงเนื้อสัมผัส และยืดอายุผลิตภัณฑ์ในขนมปังที่ไม่ส่วนผสมของกลูเตน (gluten-free bread) และอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของกลูเตน (gluten-free food) ได้ดีและมีประสิทธิภาพ (Galle และคณะ, 2012; Galle และคณะ, 2010; Schwab และคณะ, 2008) โดยในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีส่วนผสมกลูเตนออกวางขายในตลาดมากมาย เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ที่แพ้กลูเตน ซึ่งเมื่อบริโภคกลูเตนเข้าไปจะเกิดโรค celiac disease แต่ขนมปังที่ไม่มีส่วนผสมกลูเตนที่ขายตามท้องตลาดในปัจจุบันยังมีคุณภาพต่ำ รสชาติ เนื้อสัมผัสไม่ดี และมีอายุผลิตภัณฑ์สั้น พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella* sp. จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้แทนสารเติมแต่งที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน อันได้แก่ กัวกัม และ ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิล เซลลูโลส เป็นต้น (Rao และ Goyal, 2012) ซึ่งการนำไปประยุกต์ในขนมปังประเภท gluten-free ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับงานวิจัยนี้ในอนาคตต่อไป

จากการนำไปพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแบคทีเรียมาประยุกต์ในน้ำสลัด ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการประเมินทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation) แต่เนื่องด้วยพอลิแซ็กคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในธรรมชาติและอาหารหมักต่างๆ อยู่แล้ว ไม่น่าจะส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของน้ำสลัด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 สามารถนำไปประยุกต์ในน้ำสลัดได้จริงและมีความปลอดภัยในการบริโภค

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสมบัติทางเคมีเพิ่มเติม เช่น การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันนัลของพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะการเชื่อมพันธะของโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อให้เข้าใจถึงสมบัติทางกายภาพมากขึ้น
2. ควรศึกษาสมบัติทางกายภาพเพิ่มเติม เช่น สมบัติการก่อฟิล์ม และสมบัติการก่อโฟม เพื่ออาจเป็นแนวทางในการประยุกต์เพิ่มมากขึ้น
3. ควรศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 เพื่อทราบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และทราบระยะเวลาที่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด

4. ควรศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ความเป็นกรดด่าง ระยะเวลาการบ่ม และอัตราการเขย่า
5. นำสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวอิมัลชันไปประยุกต์ในน้ำสลัดรูปแบบอื่นๆ หรือ อาหารอื่นๆ เช่น นำไปใช้ในน้ำสลัดแบบใส หรือ นำไปใช้ในมายองเนส และซอสปรุงรส เป็นต้น
6. ควรนำความสามารถของสมบัติอื่นๆของพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือ อุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ความสามารถก่อการจับกลุ่ม นำไปใช้ได้ในกระบวนการเครื่องดื่ม และการบำบัดน้ำเสีย หรือนำไปประยุกต์ในขนมปัง gluten-free เป็นต้น
7. ควรติดตามผลน้ำสลัดเพิ่มเติม เช่น ความหนืด และสีของน้ำสลัด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์. 2552. ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มายองเนสและสลัดครีม. [ออนไลน์]. 2540. แหล่งที่มา: http://itc.excise.go.th/tisi/fulltext/TIS1402-2540.pdf [16 พฤศจิกายน 2555].

วราภรณ์ หิรัญวงษ์. 2550. คุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่กระทง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์. 2551. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Amari, M., et al. 2012. Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. Applied Microbiology and Biotechnology, doi 10.1007/s00253-012-4447-8.

Anonymous.1996. Bioproducts: bio-concrete. BioIndustry 13 : 56–57.

Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Salminen,S., Wright, A.V., and Ouwehand, A. 3rd ed, Microbiological and Functional Aspects, pp. 1-67. U.S. : CRC Press.

Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. Biotechnology Advances 29 : 54–66.

Boels, I.C., van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., and de Vos, W.M. 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharides production in lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11: 723–732

Bohn, J.A., and BeMiller, J.N. 1995. (1→3)-β-D-Glucan as biological response modifiers: A review of structure–functional activity relationships. Carbohydrate Polymers 28 : 3–14.

Bradford, 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.

Bramhachari, P. V., Kishor, P. B., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B. R., and Dubey, S. K. 2007. Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3. Journal of Microbiology Biotechnology 17 : 44–51.

Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., and Moineau, S. 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*: a review. Journal of Dairy Science 86, 407–423.

Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. United States of America : Waverly press.

Burgess, D.J, and Chidambaram, N. 2005. Emulsions Design and Manufacturing. In Burgess, D.J., Injectable Dispersed Systems Formulation, Processing, and Performance, pp. 213–248. New York : CRC Press.

Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 87 : 113–130

Chandra, R., and Rustgi, R. 1998. Biodegradable Polymers. Progress In Polymer Science 23 : 1273–1335.

Collins, E.A., Bares, J., and Billmeyer, F.W. 1973. Experiments in Polymer Science, New York : Wiley.

De Assis Perrechi, F., De Castro Santana, R., Fasolin, L. H., Da Silva, C.A.S., and Da Cunha, R.L. 2010. Rheological and structural evaluations of commercial italian salad dressings. Food Science and Technology (Campinas) 30 : 477–482.

Degeest, B., Vaningelgem, F., and De Vuyst, L. 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics and process engineering of heteropolysaccharides production by lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11 : 747–758.

De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 23 : 153–177.

Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids17: 25.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 : 350-356.

Emery, P., and Sanders, T. 2003. Carbohydrate. In Emery, P., and Sanders, T, Molecular Basis Of Human Nutrition, pp. 44-57. London : CRC Press.

Eriksson, K.O. 2002. Gel filtration. In Vijayalakshmi, M . A ., Biochromatography. New York : CRC Press.

Farid, M.M. 2010. Rheological Properties of Food. In Mathematical Modeling of Food Processing, pp. 31–67. New York : CRC Press.

Farnworth, E.R., Champagne, C.P., and Rose Van Calsteren, M. 2006. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: food uses, production, chemical structures, and health effects. In Wildman, R. E .C., Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods 2nd, pp. 353 - 371 . New York : CRC Press.

Feddersen, .RL., and Thorp, S.N. 1993. Polysaccharides and their derivatives. In Whistler, R.L, and BeMiller, J.N, Industrial gums 3rd , pp. 537–578.San Diego, CA: Academic Press.

Ford, L.D., Borwankar, R.P., Pechak, D., and Schwimmer, B. 2003. Dressings and Sauces. In Friberg, S. E., Larsson, K., Sjöblom, J., Food Emulsions 4th, U.S.A : Marcel Dekker.

Freitas, F., Alves, V.D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., and Reis, M.A. 2009. Emulsifying behavior and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol by product. Carbohydrate Polymers 78 : 549–556.

Freitas, F., Alves, V.D., and Reis, M.A.M. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology 29 : 388 – 398.

Friberg, S.E.,and Larsson, K. 1997. Food Emulsions 3rd. New York : Marcel Dekker.

Fried, J.R. 2000. The solid state properties of polymers. Polymer Science and Technology 2nd ed. pp.132-164. USA : Trentice-Hall.

Funami, T. 2009. Functions of food polysaccharides to control the gelatinization and retrogradation behaviors of starch in an aqueous system in relation to the macromolecular characteristics of food polysaccharides. Food Science and Technology Research 15 : 557 – 568

Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., and Ganzle, M. 2010. Exopolysaccharide forming *Weissella* strains as starter cultures for sourdough. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 : 5834–5841.

Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M.G., and Arendt, E.K. 2012. Influence of *in-situ* synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. International Journal of Food Microbiology 155 :105–112.

Galwey, A K., and Craig, D.Q.M. 2006. Thermogravimetric Analysis Basic Principles. In Craig, D.Q.M., and Reading, M., Thermal Analysis of Pharmaceuticals, pp. 139–191. New York : CRC Press.

Garai-Ibabe, G., Teresa, D.M., Ana, I., Elena, S.F., Laura, W.M., Paloma, L., Luis, C.A., and Pilar, F.P. 2010. Naturally occurring 2-substituted (1, 3)beta-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. Bioresource Technology 101 : 9254–9263.

Garti, N., and Bisperink, C. 1998. Double emulsions: Progress and applications. Current Opinion in Colloid and Interface Science 3 : 657.

Garti, N. 1997. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. Food Science and Technology 30 : 222.

Garti, N . 2000. Food Emulsifiers and Stabilizers. In Robinson, D.S. and Eskin, N . A . M., Food Shelf Life Stability Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. New York : CRC Press.

Garti, N., and Benichou, A. 2004. Recent developments in double emulsions for food applications. In Friberg, S., Larsson, K., and Sjoblom, J (eds.), Food Emulsions 4th. New York : Marcel Dekker.

Gauri, S.S., Mandal, S.M., Mondal, K.C., Dey, S., and Pati, B.K. 2009. Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacte*r sp. SSB81. Bioresource Technology 100 : 4240–4243.

Gilman, W.S. 2006. Thermal Analysis for Coatings Characterizations. In Tracton, A.A., Coatings Technology Fundamentals, Testing, and Processing Techniques, pp. 9-1 – 9-4. New York : CRC Press.

Grassi, G., Lapasin, R., Grassi, M., and Colombo, I. 2006. Rheology. In Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms A Physical and Mathematical Approach. New York : CRC Press.

Gutnick, D.L, and Bach, H. 2000. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. Applied Microbiology and Biotechnology 54 : 451–460.

Herdman, R.C. 1993. Biopolymers: making materials nature's way. Washington DC : U.S. Government Printing Office.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. Baltimore : Williams and Wilkins.

Horozov, T. S., Binks, B.P., and Gottschalk-Gaudig, T. 2007. Effect of electrolyte in silicone oil-in-water emulsions stabilised by fumed silica particles. Physical Chemistry Chemical Physics 9 : 6398–6404.

Izydorczyk, M., Cui, S.W., and Wang, Q. 2005. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. In Cui, S. W, Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications, pp.1-45. New York : CRC Press.

James, K.C. 1986. Drugs and the pharmaceutical sciences : Solubility and related properties, vol. 28, Marcel Dekker, New York .

Jolly, L., and Stingelle, F. 2001. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11, 733–745.

Jolly, L., Vincent, S.J.F., Duboc, P., and Neeser, J. R. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 82 : 367–374.

Kachlany, S.C, Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., and Ghiorse, W.C. 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. Environmental Microbiology 3 : 774–784

Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., and Tommonaro, G. 2009. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. Carbohydrate Polymers 77 : 338–343.

Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Regular, non-sporing Gram-positive rods. In Sneath, P.H.A., Mair, M.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds.). Bergey's manual of Determinative Bacteriology pp. 1208-1234. Baltimore : Williams and Wilkins.

Kang, M.S., Chung, J., Kim, S.M., Yang, K.H., and Oh, J.S. 2006. Effect *of Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Caries Research 40 : 418-425.

Kanmani, P., Satishkumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. 2011. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. Bioresource Technology 102 : 4827–4833.

Katina, K., et al. 2009. *In situ* production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. Food Microbiology 26: 734-743.

Kennedy, J.F. 1989. Carbohydrates Oxford : Oxford University Press.

Kennedy, J.F., and White, C.A. 1983. Bio-active carbohydrates pp. 116-180. Chichester : Ellis Horwood.

Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. International Journal of Biosciences 1 : 1-13.

Kim, Y., Oh, S., and Kim, S.H., 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Biochemical and Biophysical Research Communications 379 : 324–329.

Kim, M.J., Seo, H.N., Hwang, T.S., Lee, S.H., and Park, D.H. 2008. Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKkimchi3 isolated from kimchi. The Journal of Microbiology 46 : 535-541.

Koh, S.P., Arifin, N., Tan, C.P., Yusoff, M.S.A., Long, K., Idris, N.A., and Lai, O.M. 2008. Rheological properties, oxidative stability and sensory evaluation of enzymatically synthesized medium- and long-chain triacylglycerol-based salad dressings. European Journal of Lipid Science and Technology 110 : 1116-1126.

Korakli, M., and Vogel, R.F. 2006. Structure/function relationship of hompolysaccharides producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. Applied Microbiology and Biotechnology 71 : 790–803.

Krog, N. J. and Sparso, F. V. 2007. Food emulsifiers: their chemical and physical properties. In Friberg, S., Larsson, K., and Sjoblom, J (eds)., Food Emulsions, Vol. 1, pp. 45–92., Boca Raton, FL : Taylor & Francis.

Kumar, C.G., Joo, H.S., Choi, J.W., Koo, Y.M., and Chang, C.S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophillus *Baciilus* sp. I-450. Enzyme and Microbial Technology 34 : 673-681.

Laws, A.P., and Marshall, V.M. 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11 : 709–721.

Li, W.W., Zhou, W.Z., Zhang, Y.Z., Wang, J., and Zhu, X.B. 2008. Flocculation behavior and mechanisms of an exopolysaccharide from the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. Bioresource Technology 99 : 6893–6899.

Lindsay, S. 1991. High Performance Liquid Chromatography : Analytical chemistry by open learning. Singapore : John Wiley and Sons.

Lin, T.Y., and Chien, M.F.C. 2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. Food Chemistry 100 : 1419-1423.

Loesche, W.J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews 50 : 353–80.

Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhoek 76 : 317-331.

Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., and Hugenholtz, J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced byLactococcus lactis. International Journal of Food Microbiology 64 : 71–80.

McClements, D.J. 2004. Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques 2nd. New York : CRC Press.

Mogensen, G., et al. 2002. Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. International Diabetes Federation 377 : 4-10.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot R., and Remaud-Simeon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11 : 675–685.

Morris, V.J. 2006. Bacterial Polysaccharides. In Stephen, A.M., Phillips, G.O., and Williams P.A., Food Polysaccharides and Their Applications. pp. 413–454. New York : CRC Press.

Mozzi, F., et al. 2006. Diversity of heteropolysacharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. Applied and Environmental Microbiology 72 : 4431-4435.

Ogunbanwo, S.T., and Okanlawon, B.M. 2009. Influence of nutrients utilization and cultivation conditions on the production of lactic acid by homolactic fermenters. Biotechnology 8 : 107-113.

Paludan-Muller, C., Huss, H.H., and Gram, L. 1999. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. International Journal of Food Microbiology 46 : 219–229.

Pan, D., and Mei, X. 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. Carbohydrate Polymers 80 : 908–914.

Paulo, E.M., et al. 2011. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. Anais da Academia Brasileira de Ciências 84 : 495-507.

Perriere, G., and Gouy, M. 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie 78 : 364-369.

Prasanna, P.H.P., Bell, A., Grandisona, A.S., and Charalampopoulosa, D. 2012. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. infantis CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. Carbohydrate Polymers 90 : 533-540.

Prasertsan, P., Dermlim, W., Doelle, H., and Kennedy, J.F. 2006. Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers 66 : 289-297.

Rao,T.J.M., and Goyal, A. 2012. A novel high dextran yielding *Weissella cibaria* JAG8 for cereal food application. International Journal of Food Sciences and Nutrition 64 : 346 - 354.

Rozen, R., Bachrach, G., Gedalia, J., and Steinberg, D. 2001. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscous*. FEMS Microbiology Letters 195 : 205–10.

Ruas-Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilan, C.G. 2005. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Sciences 88 : 843-856.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal 12 : 163–171.

Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., and de los Reyes-Gavilan, C.G. 2009. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications. Microbial Glycobiology 45 : 887-902.

Salehizadeh, H., and Shojaosadati, S.A. 2001. Biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. Biotechnology Advances 19 : 371-385.

Sánchez, V. E., Bartholomai, G. B., and Pilosof, A. M. R. 1995. Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction, Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie 28 : 380 - 385.

Sandford, P.A. 1979. A survey of possible new polysaccharides. In Blanshard, J.M.V. and Mitchell, J.R. (ed), Polysaccharides in Food, pp. 251-262. London : Butterworths.

Sandford, P.A., Cottrell, I.W., and Pettitt, D.J. 1984. Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications. Pure and Applied Chemistry 56 : 879-892.

Schramm, L.L., and Stasiuk, E.N. 2005. Emulsions. In Hsu, J.P. and Spasic, A.M., Finely Dispersed Particles Micro-, Nano-, and Atto-Engineering, pp, 79-112. New York : CRC Press.

Schwab, C., Mastrangelo, M., Corsetti, A., and Ganzle, M. 2008. Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. Cereal Chemistry 85 : 679–684.

Shukla, S., and Goyal, A. 2011. 16S rRNA based identification of a glucanhyper producing *Weissella confusa*. Enzyme Research Volume 2011, doi: 10.4061/ 2011/250842.

Skoog, D.A., Holler F.J., and Crouch, S.R. 2007. Principles of Instrumental Analysis, 6th ed. The United States of America : David Harris.

Smitinont, T., et al. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. International Journal of Food Microbiology 51 : 105-111.

Sutherland, I.W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. Advances in Microbial Physiology 8 : 143–213.

Sutherland, I.W. 1977. Bacterial exopolysaccharides-their nature and production. In Sutherland, I.W. (ed.), Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell, pp. 27-95. London : Academic Press.

Sutherland, I.W. 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. Annual Review of Microbiology 39 : 243 – 270.

Sutherland, I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharide, New York : Cambridge University Press.

Sutherland, I.W. 1994. Structure function relationship in microbial exopolysaccharide. Biotechnology Advances 12 : 393 - 448.

Sutherland, I.W. 1998. Novel and established application of microbial polysaccharides. Trends in Biotechnology 16 : 41–46.

Sutherland, I.W. 2006. Biotechnology of microbial polysaccharides in food. In Clay, D., and Pierce, F. J ., Functional Foods and Biotechnology, pp. 583-610. New York : CRC Press.

Tako, M., Nakamura, S., and Nagahama, T. 1982. Studies on the application of polysaccharide produced by coryneform bacteria strain c-81 Physical properties of sweet bean jelly containing the polysaccharide as a stabilizing agent. Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of the Ryukyus 29 : 79-86.

Tayuan, C., Tannock, G.W., and Rodtong, S. 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Weissella* sp. from low-cost substitutes for sucrose. African Journal of Microbiology Research 5 : 3693-3701.

Tracton, A .2006. Rheology and Surface Chemistry. In Coatings Technology, pp.1-1 – 1-12. New York : CRC Press.

Ueda, S., Momii, F., Osajima, K., and Ito, K. 1981. Extracellular polysaccharide produced by strain No.626 of *Aeromonas hydrophila*. Agricultural and Biological Chemistry 45 : 1977-1981.

Venugopal, V. 2011. Marine Polysaccharides:Food Applications. Indian Institute of Technology, Mumbai.

Vijayendra S.V.N., Palanivel, G., Mahadevamma, S., and Tharanathan, R.N. 2008. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic fermented milk product. Carbohydrate Polymers 72 : 300–307.

Walling, E., Gindreau, E., and Lonvaud-Funel, A. 2005. A putative glucan synthetase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. International Journal of Food Microbiology 98 : 53–62.

Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., and Song, S. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. International Journal of Biological Macromolecules 43 : 283-288.

Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., and Bai, X. 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. Carbohydrate Polymers 82 : 895–903.

Welman, A.D., and Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology 21 : 269-274.

Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.Y., Irastorza, A., Navas, J., and López, P. 2006. *Pediococcus parvulus gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of beta-d-glucan-producing bacteria in foods and beverages. Journal of Food Protection 69 : 161–169.

Whittenbury, R. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. Journal of General Microbiology 35 : 13-26.

Wongsuphachat, W., Kittikun, A.H., and Maneerat, S. 2010. Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. Songklanakarin Journal of Science and Technology 32 : 27-35.

Yang, B., Zhao, M. M., Prasad, K. N., Jiang, G. X., and Jiang, Y. M. 2010. Effect of methylation on the structure and radical scavenging activity of polysaccharides from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. Food Chemistry 118, 364–368.

Ying, C., Liping, S., Yong, Z., Lei, W. and Liguo, A. 2006. The production-influencing factors of extracellular polysaccharide (EPS) from a strain of lactic acid bacteria and EPS extraction. Frontiers of Biology in China 3 : 236-240.

Yu, G.H., He, P.J., and Shao, L.M. 2009. Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on bioflocculability. Bioresource Technology 100 : 3193–3198.

Yun, U.J., and Park, H.D. 2003. Physical properties of an extracellular polysaccharide produced by *Bacillus* sp. CP912. Letters in Applied Microbiology 36 : 282-287.

Zajic, J. E., and Knetting, E. 1970. Development in Industrial Microbiology. Washington DC : American Institute of Biological Science.

Zamora, F., Gonzalez, M.C., Duenas, M.T., Irastorza, A., Velasco, S., and Ibarburu, I. 2002. Thermodegradation and thermal transitions of an exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. Journal of Macromolecular *Science* 41 : 473-486.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารเลี้ยงเชื้อแล็กโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS Agar) สำเร็จรูป

Lactobacilli MRS	55.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล็กโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS Agar) ผสม bromocresol purple ตามวิธีของ Ogunbanwo และ Okanlawon (2009)

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone no.3)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	5.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (di -Ammonium hydrogen citrate)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 H_2O$)	0.05	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โบรโมครีซอล เพอร์เพิล (bromocresol purple)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจากอาหารสูตรแล็กโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone no.3)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	40.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	5.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (di -Ammonium hydrogen citrate)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 H_2O$)	0.05	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

หมายเหตุ ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ผงวุ้น 15.0 กรัมต่อลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง McConkey สำเร็จรูป

McConkey สำเร็จรูป	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test medium)

ทริปโตส (Tryptose)	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	5.0	กรัม
0.5% ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์	100	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำทริปโตนและวุ้นมาต้มจนละลาย แล้วจึงใส่ 0.5% ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ แล้วตั้งไว้ให้แข็งตัวในลักษณะของ agar tall แล้วอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptophan broth

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron (TSI) **สำเร็จรูป**

Triple Sugar Iron	65.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3% โดยปริมาตร

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30%	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.0	มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ฟีนอล	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

5. สารละลายคูแมสซีบลู

ชั่งสารละลายคูแมสซี่บลู จี250 1000 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก 85 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้เป็น 1000 มิลลิลิตร

6. สารละลาย 1 % เททระเมทิลพาราฟีนิลีนไดอะมีน ไดคลอโรไฮโดรเจนคลอไรด์

เททระเมทิลพาราฟีนิลีนไดอะมีน ไดคลอโรไฮโดรเจนคลอไรด์	1.0	กรัม
น้ำเกลือปราศจากเชื้อ	100	มิลลิลิตร

7. สารละลาย Kovac's reagent

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์	10.0	กรัม
เอมิล หรือ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (amyl or isoamyl alcohol)	150	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)	50	มิลลิลิตร

นำ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ มาละลายใน ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ให้หมด หลังจากนั้น เติมกรดลงไปอย่างช้าๆ เตรียมเสร็จแล้วควรเก็บให้พ้นแสงในตู้เย็น ไม่ควรเก็บนานเกิน 2-3 วัน

8. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แคลเซียมคลอไรด์	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

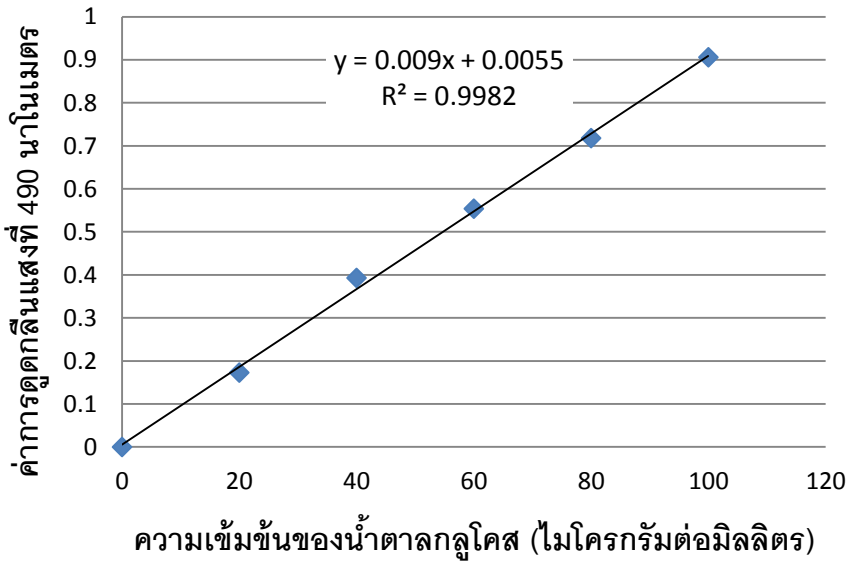
9. สารละลาย DPPH **ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์**

DPPH (1,1-ไดฟีนิล-2-พิคริลไฮดราซิล)	39.4	มิลลิกรัม
95% เอทานอล	100	มิลลิลิตร

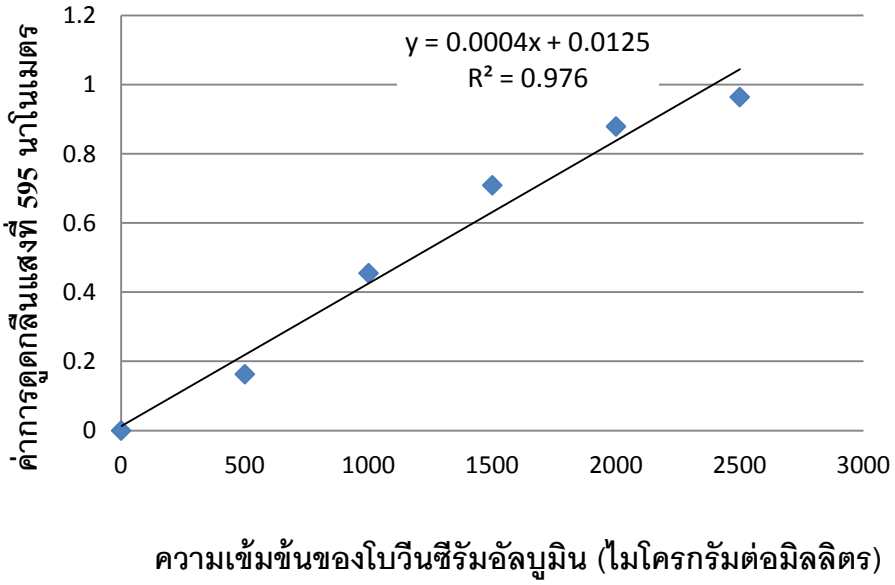
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)



2. กราฟมาตรฐานโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)



ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L06 จำนวน 1,464 bp

TGCAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCA
AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAA
ACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCA
CTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCA
TAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGA
AGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTG
ACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAA
GCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCC
TCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGAC
TGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACAC
CGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGAC
AACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTT
AGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGC
GAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTCGGGAGCCAGC
CGTCTAAGGGAACCCGGGTTGGG

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L07 จำนวน 1,428 bp

TGCAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCA
AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAA
ACAGATGCTAATACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTGTTATTTAAAAGATGGTTCTGCTATCAC
TAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGATGATGCAT
AGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAA
GGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGA
CGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAA
GCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCC
TCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGAC
TGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACAC
CGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGAC
AACTCCAGAGATGGAGTGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTC
AGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGC
GAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACC

ภาคผนวก จ

ผลของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นน้ำตาลสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ตารางที่ 1 ปริมาณและชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L07 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
ซูโครส	7.8913 ±1.25	กลูโคส
กลูโคส	0.1593 ± 0.05	กลูโคส
ฟรุกโทส	0.0587 ± 0.02	กลูโคส
แลคโตส	0.0373 ± 0.01	กลูโคส
มอลโทส	0.0353 ± 0.03	กลูโคส

ตารางที่ 2 ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L07 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 0, 2, 4 และ 6 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ความเข้มข้นของซูโครส	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์(กรัมต่อลิตร)
0 %w/v	0.0250 ± 0.001
2 %w/v	3.4480 ± 0.407
4 %w/v	5.9213 ±0.704
6 %w/v	8.4453 ± 0.297
8 %w/v	9.8680 ± 1.673
10 %w/v	12.2627 ± 2.404
12 %w/v	14.3427 ± 3.003
18 %w/v	22.3480 ± 5.576

ภาคผนวก ฉ

สมบัติความเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07

ตารางที่ 1 ลักษณะสมบัติความเป็นสารก่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L06 และ L07 ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Flocculating activity		
	พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์		
	L06	L07	กัวกัม
0.2	75.64 ±0.034	54.87±0.005	32.44±0.057
0.4	54.39±0.001	68.99±0.004	51.15±0.025
0.6	66.89±0.018	69.08±0.007	55.44±0.025
0.8	69.18±0.001	60.02±0.013	59.83±0.006
1.0	66.98±0.017	13.36±0.004	68.51±0.010

ภาคผนวก ช

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1.ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

1.1 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันถั่วเหลือง

ANOVA

pemulsifying

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.025	8	.628	.299	.956
Within Groups	35.733	17	2.102		
Total	40.758	25			

1.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันมะกอก

ANOVA

pemulsifying

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.796	8	1.099	.700	.687
Within Groups	26.688	17	1.570		
Total	35.484	25			

2.ความสามารถการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม

ANOVA

pfloc

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	80.451	2	40.225	1.846	.270
Within Groups	87.151	4	21.788		
Total	167.602	6			

3. ความคงตัวอิมัลชัน

นำผลความคงตัวอิมัลชันกับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ 0.1-0.5%w/v (ข้อที่ 4.6.4) มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ได้ผลดังนี้

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ L06

	(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	.50	.10	9.3750*	.001	4.3219	14.4281
		.20	5.1250*	.047	.0719	10.1781
		.30	7.0000*	.008	1.9469	12.0531
		.40	.2500	.920	-4.8031	5.3031

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ L07

Multiple Comparisons

Dependent Variable:pemulsifying

	(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	.50	.10	4.3750*	.020	.7573	7.9927
		.20	4.8750*	.010	1.2573	8.4927
		.30	1.8750	.297	-1.7427	5.4927
		.40	-.2500	.888	-3.8677	3.3677

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

3. แซนแทนกัม

Multiple Comparisons

Dependent Variable:emulsifying

	(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	.50	.10	7.1250*	.006	2.2693	11.9807
		.20	1.8750	.436	-2.9807	6.7307
		.30	7.0000*	.006	2.1443	11.8557
		.40	4.2500	.084	-.6057	9.1057

ภาคผนวก ซ

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต L06 และ L07

Sequence ID: lcl|41909Length: 1428Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 1428 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2582 bits(1398)	0.0	1418/1428(99%)	0/1428(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     TGCAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGA  60

             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  1     TGCAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGA  60


Query  61    CATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGA  120

             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  61    CATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGA  120


Query  121   TAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTA  180

             |||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||| || |||

Sbjct  121   TAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTGTTATTTA  180


Query  181   AAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGT  240

             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||

Sbjct  181   AAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGT  240


Query  241   AATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGA  300

             ||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

```

```
Sbjct  241   AATGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGA
300

Query  301   CTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGA
360

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  301   CTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGA
360

Query  361   AAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTG
420

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  361   AAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTG
420

Query  421   TAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGG
480

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  421   TAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGG
480



Query  481   AACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATT
540

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  481   AACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATT
540

Query  541   TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCA
600

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  541   TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCA
600

Query  601   ACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCA
660

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  601   ACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCA
660

Query  661   TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTG
720

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  661   TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTG
720
```

```
Query  721   GACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
780

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   GACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
780


Query  781   AGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCA
840

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   AGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCA
840


Query  841   GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
900

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
900


Query  901   TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
960

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
960


Query  961   TTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAG
1020

              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  961   TTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACAACTCCAGAGATGGAGTGTTCCCTTCGGGGACAAG
1020


Query  1021  GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
1080

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
1080


Query  1081  AACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGC
1140

              |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1081  AACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGC
1140


Query  1141  CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG
1200

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  1141  CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG
1200


Query  1201  GCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAAT
1260

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  1201  GCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAAT
1260


Query  1261  CTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT
1320

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  1261  CTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT
1320


Query  1321  CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG
1380

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  1321  CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG
1380


Query  1381  CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACC  1428

              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct  1381  CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACC  1428
```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วิชชุดา วิไลรัศมี เกิดวันอาทิตย์ที่ 20 พฤศจิกายน 2531 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง (เหรียญทอง) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554

รางวัลและทุนการศึกษาที่ได้รับ

- ได้รับทุนการศึกษานิสิตเรียนดีของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2553
- ได้รับโล่รางวัล นิสิตผู้สอบไล่ได้คะแนนสูงสุดของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องในวันไหว้ครูของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2553
- ได้รับประกาศนียบัตร และเข็มรางวัล การศึกษายอดเยี่ยมขั้นวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากมูลนิธิศาสตราจารย์ ดร.แถบ นีละนิธิ ครั้งที่ 44 ประจำปี 2554
- ได้รับทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2554

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน Pure and Applied Chemistry International Conference 2012 (PACCON 2012): Chemistry Beyond Boundaries ระหว่างวันที่ 11 -13 มกราคม 2555 ณ โรงแรม The Empress Hotel จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Isolation and Characterization Of Exopolysaccharide Producing-Lactic Acid Bacteria from Thai Fermented Vegetables”