รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

เรื่อง

การผลิตสารเอกโซโพลีแซกคาไรด์จากน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการออสโมซิส

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘

รหัสโครงการ ๑๑๗๕๒๑

สัญญาเลขที่ ๕๒/๒๕๕๘

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปี ๒๕๕๘

โครงการ การผลิตสารเอกโซโพลีแซกคาไรด์จากน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการออสโมซิส

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ. ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้วิจัย

ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยเฉพาะในแบคทีเรียกลุ่มแลคติกโดยจะถูกขับออกสู่นอกเซลล์ในระหว่างการเจริญ มีลักษณะเป็นเมือกหรือติดอยู่กับเซลล์ในรูปของแคปซูล ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด และเพิ่มความคงตัว สำหรับการศึกษาครั้งนี้ เป็นการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากน้ำเชื่อมเหลือทิ้งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้งและแหล่งคาร์บอนราคาถูกโดยการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Lactobacillus plantarum* TISTR 096 และ *Lactobacillus casei* TISTR 047 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, BMM และ SDM พบว่า *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงเท่ากับ 4.86$\pm$0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่เหลือจากผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้งในรูปสารละลายออสโมติกซึ่งเป็นน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนในอัตราส่วนที่แตกต่างกันจำนวน 7 สูตรพบว่าการเลี้ยง *L. casei* TISTR 047 ด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 49.9±0.66 มิลลิกรัมต่อลิตรการเลี้ยงด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดคิดเป็น 69.18±2.07 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาเลี้ยงด้วยการลดปริมาณแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เพปโตน เนื้อสกัด และยีสต์สกัด ที่ร้อยละ 50 ทำให้เชื้อผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เพิ่มขึ้นเป็น 107.17±1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าการใช้เด็กซตรินซ์เพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด 182$\pm$1.67 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเด็กทรินซ์มีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนของกลูโคสไซรัปและน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์

ในการศึกษาการสกัดและวิธีการวิเคราะห์เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรนฟีนอล-ซัลฟูริก และดีเอ็นเอส โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิดเป็นตัวสกัดคือ เอทานอลและอะซิโตน พบว่าการใช้อะซิโตนในอัตราส่วนตัวทำละลายต่อน้ำหนัก 4: 1 สกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้สูงกว่าเอทานอล และการใช้วิธีแอนโทรนวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดได้สูงกว่าวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก และดีเอ็นเอสเมื่อตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและกรดอินทรีย์พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบประกอบน้ำตาลกลูโคส เป็นส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 73.5 รองลงมาคือ น้ำตาลราฟิโนสร้อย

ละ 12.8 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เพียงเล็กน้อย จึงสรุปได้ว่าชนิดตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นhetaloexopolysaccharide ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์ พบกรดซิตริกเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ตามลำดับ

Abstract

Exopolysaccharides (EPSs) are biopolymers produced by many species of microorganisms,in particular, lactic acid bacteria. Normally, EPSs will be secreted during microorganism growth in form of mucus or capsules that attach to microbial cells. EPSs are of worldwide interest in food industries. It was applied as texture thickening agent stabilizer enhancement agents for various products.

In this study, EPSs were produced from residual syrup from semi-dried rambutan production and other cheap carbon sources. Each of 3 lactic acid bacteria namely, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Lactobacillus plantarum* TISTR 096 and*Lactobacillus casei* TISTR 047 was cultured in 3 types of culture media including MRS, BMM and SDM. It was found that *L. casei* TISTR 047 cultured in MRS (pH 6.0) gave highest EPSs of 4.86±0.15 mg/L. Thereafter, *L. casei* TISTR 047 was cultured inculture media containing 7 different proportions of residual osmotic solution of syrup from semi-dried rambutan production which was a mixture of sucrose and oligofructose that used as carbon source instead of glucose. *L. casei* TISTR 047 cultured in media contained oligosaccharide alone produced 49.9±0.66 mg/L of EPSs while culturing of this bacteria in media contained oligosaccharide and coconut juice (50% : 50%) produced highest EPSs of 69.18±2.07 mg/L. Furthermore, culture of *L. casei* TISTR 047 in media that reduced expensive nitrogen sources including peptone, beef extract and

yeast extract to 50% could produce more EPSs (107.17±1.05 mg/L). Moreover, *L. casei* TISTR 047 cultured in dextrin alone could produce highest EPSs of 182±1.67 mg/L. The latter might due to the fact that dextrin contains more glucose molecules than carbon source of glucose syrup and oligosaccharide.

Comparison of extraction and EPSs analysis methods were also conducted. Two solvents, ethanol and acetone, were used. It was found that using acetone with ratio to that of reaction mixture of 4:1 could extract more EPSs than ethanol. Three EPSs analysis methods including Anthrone method, Phenol-Sulfuric method and DNS methodwere compared. The analysis results revealed that Anthrone method gave higher values of EPSs than those obtained from Phenol-Sulfuric method and DNS method. Types of monosaccharides and organic acid characterized. Glucose and raffinose were observed as major monosaccharide with a value of 73.5% and 12.8%, respectively. The rest were other type of sugar. The results of monosaccharides determination lead to the conclusion that EPSs obtained in this study were hetaloexopolysaccharides. For organic acids, amount of citric acid, lactic acid and acetic acid were found, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๕๒/๒๕๕๘ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคระกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ทั้งนี้โครงการวิจัยนี้จัดทำภายใต้แผนการวิจัยเรื่อง การเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์ให้กับผลเงาะครบทุกส่วนโดยการ นำส่วนเนื้อ เปลือกและเมล็ดเงาะมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง เพื่อลดปัญหาผลผลิตเงาะล้นตลาด และต้องขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยร่วมกันดำเนินด้วยดีตลอด

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
กิตติกรรมประกาศ	
สารบัญ	
บทนำ	1
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย	4
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
กรอบโครงการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การดำเนินการวิจัย	7
รายละเอียดในการดำเนินการวิจัย	7
ผลและอภิปรายผลการวิจัย	14
สรุปการวิจัย	51
บรรณานุกรม	53
ภาคผนวก	63

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์	15
2	ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ของแ *Lactobacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์	16
3	การเจริญในอาหาร MRS BMM และ SDM ของเชื้อ *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์	17
4	ปริมาณกรดแลคติกในอาหาร MRS BMM และ SDM ของเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์	18
5	ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในสูตรอาหาร MRS BMM และ SDM ของเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์	19
6	การผลิตปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียในอาหารสูตร MRS BMM และ SDM ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์	20
7	การเจริญของ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน	22
8	การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ของ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน	22

9	การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง	24
10	ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง	26
11	ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง	27
12	การเจริญและปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน	30
13	การเจริญและปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน	32
14	การเจริญและปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L.casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีน้ำตาลมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน	34
15	การเจริญและปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ *L.casei* TISTR 047ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลงที่มี น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน	36
16	ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L.casei* TISTR 047ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง	38
17	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการทดสอบกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้สารละลายแอนโทรนที่ถูกเตรียม 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับสารละลายแอนโทรนที่เตรียมใหม่	40
18	ลักษณะสีของสารละลายหลังจากถูกทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายแอนโทรนในปริมาตรต่างๆกัน	42
19	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง และเปรียบเทียบกับการทดลองที่อุณหภูมิห้อง	43

20 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างที่สกัดโดยเอทานอล และอะซิโตนโดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์ 46
21 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตน โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์ อัตราส่วนต่าง ๆ กัน 48
22 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตน โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์ อัตราส่วนต่าง ๆ กัน 50

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1	ความเข้มข้นของตัวถูกละลายของสารละลายออสโมติกที่ใช้ในการทดลอง	10
2	ปริมาณน้ำตาลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีแอนโทรน	39
3	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำกราฟมาตรฐาน	39
4	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำกราฟมาตรฐานปริมาตรแอนโทรนแตกต่างกัน	41
5	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำกราฟมาตรฐานที่วิเคราะห์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	43
6	ปริมาณน้ำตาลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก	44
7	ปริมาณน้ำตาลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีดีเอ็นเอส	44
8	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการย่อยและปรับ ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีดีเอ็นเอสในการวิเคราะห์	45
9	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักโดยลดขั้นตอนการปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีดีเอ็นเอสในการวิเคราะห์	46
10	ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์	47
11	ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยอะซิโตน โดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์	47
12	ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์	49
13	ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยอะซิโตน โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์	49

บทที่ 1

บทนำ

1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากกรอบแนวคิดในการทำงานวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้งให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพมูลค่าสูงของภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเลือกใช้การดึงน้ำออกวิธีออสโมซิสร่วมกับการทำแห้ง ซึ่งเลือกใช้วิธีการการกำจัดน้ำออกด้วยการแช่ผลไม้ในน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยหลักความแตกต่างของอัตราเร็วในการแพร่ระหว่างน้ำตาลกับน้ำ เพื่อใช้ในการควบคุมปริมาณของน้ำที่ต้องการจะดึงออกและปริมาณของของแข็งที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนของปริมาณน้ำและปริมาณของแข็งในชิ้นอาหารก่อนเข้าสู่สภาวะสมดุล โดยที่สภาวะสมดุลของน้ำเกิดได้เร็วกว่าสภาวะสมดุลของน้ำตาล จนถึงสภาวะของทั้งน้ำและน้ำตาลจะได้ผลิตภัณฑ์ในลักษณะของผลไม้แช่อิ่มที่มีน้ำตาลสูง โดยกระบวนการออสโมซิสนี้สามารถกำจัดน้ำได้ประมาณร้อยละ 30-50 ของน้ำหนักเริ่มต้นของชิ้นอาหาร ทำให้มีส่วนเหลือของสารละลายผสมจากน้ำตาลและน้ำจากผลไม้เกิดขึ้น จึงเป็นแนวคิดในการทำงานวิจัยต่อยอด โดยนำส่วนเหลือของสารละลายผสมซึ่งมีน้ำตาลเหลืออยู่มาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกเพื่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ โดยใช้น้ำตาลซูโครสและสารให้ความหวานจากฟรุตโตโอลิแซคคาร์ไรค์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เป็นโปรไบโอติกเพื่อให้สามารถย่อยสลายสารให้ความหวานจากฟรุตโตโอลิโกแซคคาร์ไรค์ซึ่งเป็นพรีไบโอติกได้ดียิ่งขึ้น

ดังนั้นกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย ประกอบด้วยการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์สูง โดยให้ความสนใจกลุ่มโปรไบโอติกซึ่งสามารถใช้สารให้ความหวานชนิดโอลิโกฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี การใช้สารอาหาร และการสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เป็นการใช้สารอาหารราคาถูกที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ทดแทนองค์ประกอบอื่นๆ ในสูตรอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นการปรับเปลี่ยนสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการใช้น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นส่วนเหลือจากนำเนื้อมะพร้าวมาปรุงอาหารมาเป็นแหล่งของสารอาหารอื่นๆ เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ได้สูงขึ้นเพื่อต้นทุนการผลิตลง ศึกษาการแยกบริสุทธิ์ที่เหมาะสม โดยศึกษาวิธีการสกัด ตลอดจนชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายเพื่อตกตะกอนพอลิเมอร์ เพื่อแยกปริมาณเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ได้สูงและมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์

เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ (Exopolysaccharide, EPS) เป็นโพลิแซคคาร์ไรค์สายยาวที่ประกอบด้วยน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และแรมโนสหลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (Welman & Maddox, 2003) สำหรับเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ของแบคทีเรียแลคติก แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มโฮโมโพลิแซคคาร์ไรค์ (homopolysaccharide) เป็นโพลิแซคคาร์ไรค์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซคคาร์ไรค์ชนิดเดียวกัน เช่น เด็กซ์แทรน พูลลูแลน กลูแคน ลีแวน เป็นต้น

พอลิเมอร์ชนิดนี้ถ้าประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเรียกว่า กลูแคน ถ้าประกอบด้วยน้ำตาลฟรุตโตส เรียกว่า ฟรุตแทน ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พอลิเมอร์จะแตกต่างไปตามชนิดของน้ำตาลเริ่มต้นและมีผลต่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่สร้างได้ 2) กลุ่มเฮทเทอโรโพลิแซคคาร์ไรค์ (heteropolysaccharide) เป็นโพลิแซคคาร์ไรค์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซคคาร์ไรค์ต่างชนิดกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น เจลแลน แซนแทน เป็นต้น แบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นโพลิแซคคาร์ไรค์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลกลูโคส และอาจพบน้ำตาลแรมโนส ฟรุตโตส และแมนโนสด้วย (Lawset al., 2001,Van den Berg et al.,1995, Welman & Maddox, 2003) ในการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ ด้วยกระบวนการหมักจากแบคทีเรียแลคติกจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญคือสารอาหารและสภาวะที่เหมาะสม พบว่าการสร้างพอลิเมอร์ของแบคทีเรียแต่ชนิดและแต่ละสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และชนิดของไนโตรเจนก็มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพลิแซคคาร์ไรค์ ปัจจุบันการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ในทางการค้าได้สนใจใช้แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid Bacteia, LAB) เนื่องจากได้รับความยอมรับความปลอดภัยสูงจัดอยู่ในกลุ่ม GRAS ทั้งนี้จะเป็นกลุ่มที่พบในอาหารหมักเป็นส่วนใหญ่ (De Vuyst & Degeest, 1999 , Welman & Maddox, 2003) โดยนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเป็นสารเพิ่มความคงตัว ป้องกันการไหลเยิ้มของเจล เพิ่มความหนืด ปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น (Sutherland, 1998)ในการใช้ประโยชน์ของโพลีแซคคาร์ไรค์ถูกนำมาใช้ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเป็นสารเพิ่มความคงตัว ป้องกันการไหลเยิ้มของเจล เพิ่มความหนืด ปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น (Sutherland, 1998) อีกทั้งมีรายงานการใช้แบคทีเรียแลคติกเพื่อผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ที่ดีต่อสุขภาพ พบว่า มีประโยชน์ในการต้านการเจริญของเนื้องอก เพิ่มระบบการสร้างภูมิคุ้มกันแก่ร่าง และการลดลงของระดับคลอเรสเตรอลในเลือด (Kitazawa et al.,1998, Hosono et al., 1997, Chabot et al., 2001 และ Nakajima et al.,1992)

การผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์จากจุลินทรีย์ ซึ่งผลิตขึ้นในขณะเจริญและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีลักษณะเป็นเมือกหรืออาจเกาะติดที่ผนังเซลล์ในลักษณะแคปซูล เพื่อป้องกันตัวเซลล์จากสภาพแวดล้อม พบได้ทั้งในแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* และ *Leuconostoc dextransucrase* (Macedo, et al., 2002, Vaningelgem et al., 2004,Mozzi et al., 2003, Naessens et al., 2005) รา เช่น *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazi*, *Cordyceps* sp., *Lentinus edodes* และ *Grifola frondosa* (Mahapatra & Banerjee, 2013) และสาหร่ายเช่น *Microcystis aeruginosa* และ *Nostoc sp.* เป็นต้น โดยทั่วไปโพลิแซคคาร์ไรค์ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ จะให้ชนิดของเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ที่มีความหลากหลายมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ คือ ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ องค์ประกอบของสารอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตลอดจนสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง (Tallon et al., 2003) สำหรับในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกมีปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง โพลิแซคคาร์ไรค์ หลายประการ จากรายงานแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้

แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ส่วนแหล่งไนโตรเจนพบว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญและการสังเคาะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรด์ จากรายงานแบคทีเรียแลคติกสามารถ ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายกลุ่มเช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแมนโนส (Aslim et al., 2005; Cerning et al., 1994; Gamar et al., 1997; Smitinont et al., 1999, Senini et al.,2004; Tallon et al., 2003; Bauer et al., 2009; Xu et al.,2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แหล่งคาร์บอนกลุ่มอื่นๆ เช่น กากน้ำตาลจากหัวบีท (Yeniel et al.,2006) หางนม (Macedo et al., 2002), แป้งสาคู (Yeesang et al., 2008)

ส่วนการใช้แหล่งไนโตรเจนพบว่าการเติมแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ การเติมกรดคาร์ซามิโนเพียงร้อยละ 1 จะเพิ่มความสามารถในการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคา ร์ไรค์เพิ่มขึ้น (Cerning et al., 1992, 1994) ส่วนรายงานของ Van den Berg และคณะ (1995) พบว่าการใช้ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซิเตรท 0.6 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้ยีสต์สกัด 6.7 กรัมต่อลิตร มีผลต่ออัตราส่วนของน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลแรมโนสที่เป็นองค์ประกอบในเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ แม้ว่าการใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกันก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำตาล ส่วนการใช้เปปโตนต่อยีสต์สกัดในอัตราส่วน 2.5: 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้น้ำตาลแล คโตสร้อยละ 10เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าองค์ประกอบของเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์เป็นน้ำตาลกาแลคโตสต่อน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 4: 1 จากรายงานของ Seesuriyachan และคณะ (2011) พบว่า การเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกด้วยน้ำตาลซูโครส ร่วมกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แหล่งไนโตรเจนจากเปปโตนต่อยีสต์สกัดต่อเนื้อสกัดในอัตราส่วน 5: 2.5: 2.5 กรัมต่อลิตร โดยการใช้น้ำมะพร้าวจะสามารถลดการใช้ไนโตรเจนลงได้ประมาณร้อยละ 50

ระยะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ ถึงแม้ว่าการสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ แต่พบว่าจะสร้างในปริมาณสูงในช่วง 25 ชั่วโมงแรกของการเจริญในกรณีเป็นเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ชนิดเกาะติด แต่ถ้าเป็นชนิดปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จะผลิตเพิ่มขึ้นตามเวลา โดยจะผลิตได้สูงสดในระยะ log phase และในระยะต้นของ stationary phase เป็นส่วนใหญ่ทั้งนี้ขึ้นอยู่ปัจจัยอื่นๆ และสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วย (Duenas et al, 2003)

นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดและสายพันธุ์ ก็มีผลโดยตรงต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ พบว่าในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกต้องการพีเอชในการเจริญใกล้เคียง 6.0 เนื่องจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์จะมีประสิทธิภาพสูงที่ค่าพีเอช 5.8 ส่วนการสร้างมวลเซล์จะเกิดขึ้นได้ที่พีเอช 6.2 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วย ดังนั้นการควบคุมพีเอชเป็นสิ่งสำคัญมาก เนื่องจากกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก อาจจะย่อยเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ ทำให้ผลผลิตลดลง (Van den Berg et al., 1995) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ จะแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด ต้องการอุณหภูมิและพีเอชที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อ (Aslim et al., 2005)

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ (Exopolysaccharide) เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสีและอุตสาหกรรมสิ่งทอ ใช้ทำหน้าที่ปรับปรุงคุณสมบัติด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เป็นหลัก (Sutherland, 1998) โดยมีรายงานการใช้ เอ็กซ์โซโพลีแซคคาร์ไรค์ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย ลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด มีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร (Kitazawa et al.,1991, Kitazawa et al.,1998, Hosono et al., 1997, Law et al., 2001 , Chabot et al., 2001 และ Nakajima et al.,1992,Rodrigues et al., 2005) นอกจากนี้ เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติก (prebiotic) เนื่องจากมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกได้ (Dell Bello, 2001) จึงได้มีการนำเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์มาใช้ในเป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อเพิ่มกากใย (dietary fiber) ในการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพอีกด้วย (CISZEK-LENDA, 2011) ด้วยเหตุที่เอ็กซ์โซโพลีแซคคาร์ไรค์จากจุลินทรีย์ได้เข้ามาบทบาทต่ออุตสาหกรรมต่างๆมากมายอีกทั้งเป็นสารที่มีผลดีต่อการดูแลสุขภาพ การพัฒนางานวิจัยเพื่อสนับสนุนการผลิตเอ็กซ์โซโพลีแซคคาร์ไรค์จากจุลินทรีย์โดยใช้ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นแนวทางสำคัญในการสร้างมูลค่าเพิ่มแล้วยังช่วยลดต้นทุนการจัดการสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี

เงาะ (*Nephelium lappaceum* Linn.) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญของประเทศที่มีอุปทานมากกว่าอุปสงค์ทำให้เกิดปัญหาราคาผลผลิตตกต่ำ ประกอบกับฤดูกาลให้ผลผลิตอยู่ในช่วงเวลาเดียวกับผลไม้อื่นอีกหลายชนิด การแปรรูปผลิตภัณฑ์เป็นทางออกสำคัญที่จะช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มปัจจุบันมีการนำเงาะมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าหลายรูปแบบและที่น่าสนใจ คือ การแปรรูปของผู้ประกอบการขนาดกลางและเล็กรวมทั้งกลุ่มวิสาหกิจชุมชน เช่น กลุ่มวิสาหกิจชุมชนธารทอง (http://www.otop5star.com/pop_up01-th.php?id=454) สำหรับ ผลิตภัณฑ์แปรรูปเงาะครบวงจรทั้งจากส่วนของเปลือก เนื้อ และเมล็ด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เงาะแช่อิ่มอบแห้งในน้ำเสาวรส น้ำเงาะเข้มข้น เนื้อเงาะแผ่นกรอบ ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูพร้อมดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำเงาะ เมล็ดเงาะเคลือบปรุงรส ผลิตภัณฑ์ใยอาหารจากเปลือกเงาะ ผลิตภัณฑ์แป้งจากเมล็ดเงาะ และการใช้เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเงาะสด ซึ่งเป็นผลงานจากการค้นคว้าของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(http://www.tistr.or.th/tistr/newsboard/shownews.php?Category= newsboard&No=330)แนวทางหนึ่งของการสร้างมูลค่าเพิ่มจากเงาะ คือ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง โดยวิธีออสโมซิสเพื่อเติมสารเพิ่มความหวานเข้าไปในเนื้อเงาะร่วมกับการอบแห้งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์กึ่งแห้งที่มีคุณภาพดี ในการออสโมซิสทำได้โดยแช่ชิ้นผลไม้ในสารละลายออสโมติกที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างผลไม้กับสารละลายออสโมติกที่ใช้แช่ชิ้นผลไม้ โดยการใช้น้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส (Oligofructose) ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเป็นสารละลายออสโมติก เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนของกระบวนการออสโมซิส ส่วนเหลือสำคัญของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คือ สารละลายผสมซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกเพื่อผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ได้

โครงการวิจัยนี้ มุ่งพัฒนาความรู้ด้วยการต่อยอดงานวิจัยเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มจากของเหลือจากการพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้งโดยการนำสารละลายน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการออสโมซิสเนื้อเงาะมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกเพื่อพัฒนาการผลิตสารเอ็กซ์โซโพลีแซคคาร์ไรค์ในระดับห้องปฏิบัติการ

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับส่วนเหลือของสารละลายของสารให้ความหวานผสม ที่ใช้ในการวิจัยผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง เพื่อผลิตเอ็กซ์โซโพลีแซคคาร์ไรค์
2) เพื่อพัฒนาการใช้สารอาหารราคาถูกที่เหมาะสมในการหมักแบคทีเรียแลคติกที่ชักนำให้เกิดการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ปริมาณสูงขึ้น

4. กรอบโครงการวิจัย

จากแนวทางการศึกษาเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง เพื่อลดปัญหาภาวะการล้นตลาดของเงาะสด และเงาะที่มีขนาดไม่ได้มาตรฐานสู่โรงงานการผลิตเงาะกระป๋องของภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งทำให้มีสารละลายผสมของน้ำตาลเกิดขึ้นจากการพัฒนาผลิตภัณฑ์ จึงได้ทำวิจัยต่อยอดเพื่อนำส่วนเหลือในรูปแบบสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส มาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ ร่วมกับการใช้น้ำมะพร้าวทดแทนแหล่งอาหารอื่นๆ ของแบคทีเรีย โดยแบ่งขอบเขตการวิจัย ได้ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์สูง โดยให้ความสนใจกลุ่มโปรไบโอติกซึ่งสามารถใช้สารให้ความหวานชนิดโอลิโกฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

ส่วนที่ 2 เป็นการใช้สารอาหารราคาถูกที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ทดแทนองค์ประกอบอื่นๆในสูตรอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นการปรับเปลี่ยนสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการใช้น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นส่วนเหลือจากนำเนื้อมะพร้าวมาปรุงอาหารมาเป็นแหล่งของสารอาหารอื่นๆ เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ได้สูงขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตลง ตลอดจนค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

ส่วนที่ 3 เป็นการแยกบริสุทธิ์ที่เหมาะสม โดยศึกษาวิธีการสกัด ตลอดจนชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายเพื่อตกตะกอนพอลิเมอร์ เพื่อแยกปริมาณเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ได้สูงและมีความบริสุทธิ์ ก่อนนำไปตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ผลิตภัณฑ์เอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

การดำเนินงานวิจัยตามโครงการวิจัยที่เสนอนี้คาดว่าจะมีศักยภาพในการอำนวยประโยชน์ด้านต่างๆ ดังนี้

1) การสร้างองค์ความรู้เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการใช้สารอาหารเพื่อสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณสูง โดยสามารถ

เผยแพร่องค์ความรู้ในวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง และการเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการภายในประเทศ

2) ประโยชน์ด้านการบริการความรู้แก่ประชาชน การบริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ
3) ประโยชน์ด้านการพัฒนาการเรียนการสอนสำหรับนิสิต นักศึกษาที่กำลังศึกษาด้านวิทยาศาสตร์
4) ประโยชน์ด้านการสร้างและพัฒนานักวิจัย ผ่านกระบวนการฝึกหัดทำวิจัยในรายวิชาปัญหาพิเศษสำหรับนิสิตปริญญาตรีและการทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา

บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

รายละเอียดในการดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและจุลินทรีย์

1.1วัตถุดิบ

1.1.1 น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์
1.1.2 น้ำตาลทรายแดง(ทางการค้า ยี่ห้อมิตรผล)
1.1.3 เด็กซ์ทริน(แป้งที่ได้จากการย่อย)
1.1.4 กลูโคสไซรัป(ทางการค้า ยี่ห้อมิตรผล)
1.1.5 น้ำมะพร้าว

1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Lactobacillus plantarum* TIST 926 และ *Lactobacillus casei* TISTR 047 ได้จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทย สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 De Man Rogosa Sharpe (MRS) Man และคณะ (1960)
2.2 Basal minimal medium (BMM) Morishitaและคณะ (1981)
2.3 Semidefined Medium (SDM) Sanchez และคณะ (2006)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น CP224S ของ SATORIUS
3.2 เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น CP3202S ของ SATORIUS
3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลางความสูงรุ่น Z 323 K ของ HERMLE
3.4 เครื่องผสมสารรุ่น G-5606E ของ VORTEX GENIE
3.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิรุ่น AM 002 ของ BOILING-STERILIZER
3.6 หม้อนึ่งความดันรุ่น HA-300 MII ของ HIRAYAMA
3.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น Basic pH meter 1330 ของDENVERINSTRUMENT
3.9 เครื่อง Vortex-genie 2 รุ่น G-560
3.10 ตู้อบรมร้อน (Hot Air Oven) รุ่น SHEL LAB SL 1375 FX
3.11 ตู้เย็น
3.12 เตาไมโครเวฟ (microwave)

3.13 ปิเปตดูสารปริมาณน้อย Gilson ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
3.14 คิวเวตแก้วHellma
3.15 ชุดเครื่องแก้ววิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก
3.16 กระบอกตวงขนาด 1000, 100 และ 10 มิลลิลิตร
3.17 ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 และ 10 มิลลิลิตร
3.18 บีกเกอร์ขนาด 2,000, 1,000, 250 และ 100 มิลลิลิตร
3.19 ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 และ 250 มิลลิลิคร
3.20 หลอดทดลอง
3.21 หลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube)
3.22 หลอดหยดสาร (dropper)
3.23 ห่วงเขี่ยเชื้อ
3.24 แท่งแก้วคนสาร
3.25 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
3.26 กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์
3.27 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.28 ช้อนตักสารเคมี

4. สารเคมี

4.1 กรดไฮโดรคลอลิก(hydrochloric acid)
4.2 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)
4.3 กลูโคส (glucose)
4.4 แอนโทรน (anthrone)
4.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)
4.6 ฟีนอล์ฟทาลีน(phenolphthalein)
4.7 แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต(manganese sulfate hephydrate)
4.8 แมงนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate)
4.9 เฟปโตน(peptone)
4.10 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)
4.11 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
4.12 ทวีน80 (tween 80)
4.13 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen phosphate)
4.14 โซเดียมอะซิเตท(sodium acetate)
4.15 ไตรแอมโมเนียมซิเตท(tri-ammonium citrate)
4.16 เอทานอล(ethanol)
4.17 เทรปโตน(Tryptone)
4.18 ซอยโตน (Soytone)
4.19 โซเดียมคลอไรด์(Sodium chloride)
4.20 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium DihydrogenPhophate)

4.21 เฟอร์รัสซัลเฟต(Ferrous sulfate)
4.22 แอมโมเนียมซัลเฟต(Ammonium sulfate)
4.23 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride)

5. วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและจลนพลศาสตร์ของการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

1) การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS (Man และคณะ, 1960) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15นาทีปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Lactobacillus plantarum* TISTR 92และ *Lactobacillus casei* TISTR 047 ลงในอาหารสูตร MRSนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-15ชั่วโมง

2) การเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS

นำแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ ได้แก่ เชื้อ แบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ เพื่อหาตรวจสอบการเจริญและความสามารถในการสร้างพอลิเมอร์โดยเบื้องต้น โดยเลี้ยงในอาหารMRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการ เจริญของแบคทีเรียแลคติก (Kimmelet al., 1998) เพื่อตรวจสอบการเจริญ ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด และการสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์

3) การคัดเลือกสูตรอาหารและสายพันธุ์จุลินทรีย์ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อแบคทีเรีย *L.plantarum* TISTR 050, *L.plantarum* TISTR 96 และ *L. casei*TISTR 047 โดยใช้ปริมาตรร้อยละ 2 ลงในอาหารเลี้ยงสูตร MRS, BMM และ SDM ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต การผลิตกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล ปริมาณ การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ และวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนไป

4) การศึกษาสภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

นำแบคทีเรียและสูตรอาหารที่ให้ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น ในการเลี้ยงปริมาตรร้อยละ 2 ลงในสูตรอาหารเลี้ยงทำการปรับค่าความเป็นกรดด่าง ดังนี้

สูตรที่ 1 คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0
สูตรที่ 2 คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5
สูตรที่ 3 คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0
สูตรที่ 4 คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5
สูตรที่ 5 คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0

โดยเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต การผลิตกรดแลคติกปริมาณน้ำตาล ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และติดตามค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไป

ตอนที่ 2 การศึกษาน้ำตาลที่เหลือจากผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายออสโมติก ในรูปแบบสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส เพื่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์

จากการโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง ของภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ใช้สารละลายผสมของน้ำตาลสองชนิด ดังแสดงในตาราง ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส (Oligofructose, Frutalose L60) ซึ่ง มีคุณสมบัติพรีไบโอติกที่ให้พลังงานต่ำกว่าน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเป็นข้อดี คือ เป็นอาหารชั้นดีให้กับแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มโปรไบโอติกที่นำมาใช้ในการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาไรค์ ในการศึกษานำเฉพาะส่วนสารละลายผสมที่เหลือที่ได้รับการคัดเลือกจากตารางที่ 1 เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง มาใช้ในการทดลอง ทำโดยนำส่วนสารละลายผสมที่เหลือที่ได้ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลความเข้มข้นสูงมาก นำมาเจือจางด้วยอาหารที่คัดเลือกได้ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ในอัตราส่วนสารละลายผสมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ กัน โดยคิดให้มีปริมาณน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 2-10 เลี้ยงและตรวจสอบการเจริญ ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติก และการสร้างเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ จากอาหารที่มีอัตราส่วนของน้ำตาลแตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของตัวถูกละลายของสารละลายออสโมติกที่ใช้ในการทดลอง

สิ่งทดลองที่	น้ำตาลซูโครส (%w/w)	น้ำตาลโอลิโกฟรุคโตส (%w/w)
1	-	50
2	50	-
3	5	45
4	10	40
5	15	35
6	20	40
7	25	25

ตอนที่ 3 การใช้สารอาหารราคาถูกที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ทดแทนอาหารสังเคราะห์

ทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดจากหัวข้อที่ 5.3 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงปริมาตรร้อยละ 2 ลงในสูตรอาหารที่คัดเลือก และทำการดัดแปลงแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน4ชนิด ได้แก่ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ น้ำตาลทรายแดง กลูโคสไซรัปเด็กซ์ทริน

1) การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยทำการดัดแปลงแหล่งคาร์บอนซึ่งมีอัตราส่วนของน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าวดังนี้โดยใช้ชุดควบคุม MRS

สูตรที่ 1 น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 50)

สูตรที่ 2 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 5:45)

สูตรที่ 3 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 10:40)

สูตรที่ 4 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 15:35)

สูตรที่ 5 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 20:30)
สูตรที่ 6 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 25:25)

2) การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยการดัดแปลงแหล่งคาร์บอนซึ่งมีอัตราส่วนของน้ำตาลทรายแดงต่อน้ำมะพร้าวดังนี้โดยใช้ชุดควบคุม MRS

สูตรที่ 1 น้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 50)
สูตรที่ 2 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 5:45)
สูตรที่ 3 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 10:40)
สูตรที่ 4 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 15:35)
สูตรที่ 5 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 20:30)
สูตรที่ 6 น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 25:25)

3) การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยการดัดแปลงแหล่งคาร์บอนซึ่งมีอัตราส่วนของกลูโคสไซรัปต่อน้ำมะพร้าว โดยใช้ชุดควบคุม MRS

สูตรที่ 1 กลูโคสไซรัป(ร้อยละ 50)
สูตรที่ 2 น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 5:45)
สูตรที่ 3 น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป(ร้อยละ 10:40)
สูตรที่ 4 น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 15:35)
สูตรที่ 5 น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 20:30)
สูตรที่ 6 น้ำมะพร้าวต่อ กลูโคสไซรัป (ร้อยละ 25:25)

4) การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยการดัดแปลงแหล่งคาร์บอนซึ่งมีอัตราส่วนของเด็กซ์ทรินต่อน้ำมะพร้าว โดยใช้ชุดควบคุม MRS

สูตรที่ 1 เด็กซ์ทริน(ร้อยละ 50)
สูตรที่ 2 น้ำมะพร้าวต่อเด็กซ์ทริน (ร้อยละ 5:45)
สูตรที่ 3 น้ำมะพร้าวต่อเด็กซ์ทริน (ร้อยละ 10:40)
สูตรที่ 4 น้ำมะพร้าวต่อเด็กซ์ทริน (ร้อยละ 15:35)
สูตรที่ 5 น้ำมะพร้าวต่อเด็กซ์ทริน (ร้อยละ 20:30)
สูตรที่ 6 น้ำมะพร้าวต่อเด็กซ์ทริน (ร้อยละ 25:25)

ในการทดลองทุกครั้งจะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต การผลิตกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และติดตามค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงไป

ตอนที่ 4 การศึกษาวิธีการแยกบริสุทธิ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์สูงที่สุด

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในสภาวะที่ปรับสารอาหารต่างๆ ให้มีความเหมาะสม เพื่อผลิตสารเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ โดยศึกษาวิธีการสกัด ตลอดจนชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายเพื่อตกตะกอนพอลิเมอร์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lin & Chang Chien (2007), Duenas, และคณะ (2003) และ Smitinont และคณะ (1999) ตรวจสอบกรดอินทรีย์ และชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ด้วย HPLC ดัดแปลงจากวิธีการของ Yang และคณะ (2005)

4.1 การศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยการวัดทางอ้อม ในรูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดด้วยการใช้เทคนิค Spectrophotometry โดยเตรียมการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากส่วนของน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ทำการแยกเซลล์ออกแล้ว และนำมาสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 (ดัดแปลงจาก Smitinont และคณะ, 1999) จากนั้นนำส่วนตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ วิธีแอนโทรน วิธีฟีนอลซัลฟูริกและวิธีดีเอ็นเอส

4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลโดยใช้ วิธีแอนโทรน (ดัดแปลงจาก Dreywood, 1946)

ในการวิเคราะห์ด้วยแอนโทรนมีขั้นตอนดังนี้ นำตัวอย่างมาเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายแอนโทรนปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 6 20 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) ทั้งนี้ได้ศึกษาระยะเวลา ปริมาตรสารละลาย และอุณหภูมิในการทดลองที่เหมาะสมในการใช้สารละลายแอนโทรน

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้ วิธี ฟีนอลซัลฟูริก(ดัดแปลงจาก Dubois, 1959)

ในการวิเคราะห์ด้วยฟีนอลซัลฟูริกมีขั้นตอนดังนี้ นำตัวอย่างเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และวางไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเป็นสารมาตรฐาน

4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอ็กซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีดีเอ็นเอส (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

เนื่องจากวิธีดีเอ็นเอสเป็นวิธีที่ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ดังนั้นจำเป็นต้องทำการย่อยตัวอย่างพอลิแซคคาไรด์ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยใช้กรด จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเป็นกลางโดยมีขั้นตอนในการดำเนินงานดังนี้ นำส่วนใสจากตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นและปรับค่าความเป็นกรดด่าง โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 5

มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 11 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ต่อไป

ขั้นตอนการวิเคราะห์ นำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ดีเอ็นเอสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็น 5 นาที นำไปเติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้ได้ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำตาล และการปรับอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีดีเอนเอส

4.2 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (ดัดแปลงจาก Smitinont และคณะ, 1999)

การศึกษาครั้งนี้ได้ได้ทำการเลือกตัวทำละลายสองชนิดได้แก่เอทานอล และอะซิโตนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ โดยการนำส่วนใสจากตัวอย่างน้ำหมักมาเติมตัวทำละลายคือ เอทานอลหรืออะซิโตนที่แช่เย็นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายเดิมที่แช่เย็นสองครั้ง และนำไปทำแห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรน วิธีฟีนอลซัลฟูริก และวิธีดีเอ็นเอส

4.3 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (ดัดแปลงจาก Smitinont และคณะ, 1999)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหมักที่ใช้ในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ ทำโดยการนำส่วนใสจากตัวอย่างน้ำหมักมาเติมตัวทำละลายคือเอทานอลหรืออะซิโตน ที่แช่เย็นในอัตราส่วนต่างๆ กันคือ 0.5: 1, 1: 1, 1.5: 1, 2: 1, 3: 1 และ 4: 1 ทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายเดิมที่แช่เย็นสองครั้ง และนำไปทำแห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรน และวิธีฟีนอลซัลฟูริก

4.4 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและกรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

เตรียมตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยง มาทำการย่อยด้วยกรดซัลฟูริค 1 M ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0-90 mM เป็นเวลา 25 นาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้คอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุคือ Carbopac PA1 โดยมีน้ำตาลมาตรฐานคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลฟรุคโตส ที่ละลายใน 1 โมลกรดซัลฟูริก สำหรับกรดอินทรีย์นำตัวอย่างส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วย HPLC เช่นเดียวกัน โดยเตรียมสารมาตรฐานได้แต่ กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดอะซิติก

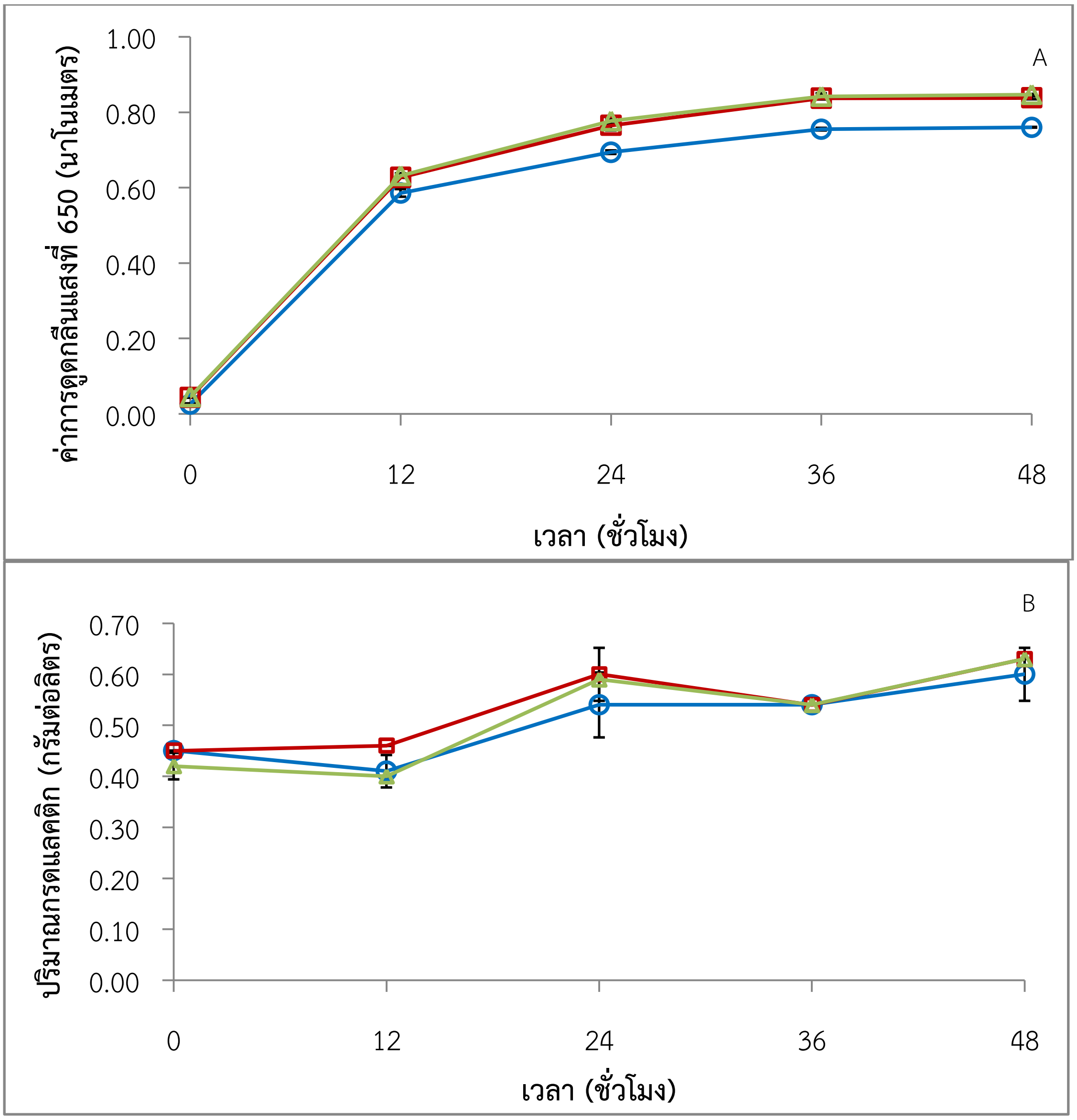
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการสร้างผลิตภัณฑ์ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

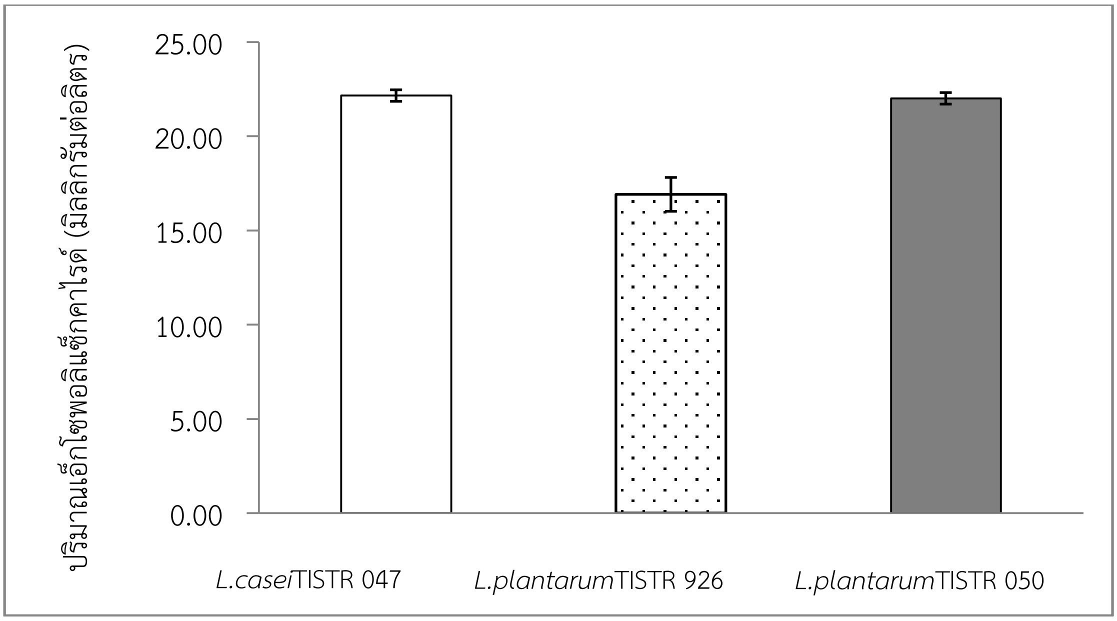
1.1 การเปรียบเทียบแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จำนวน 3 สายพันธุ์

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Lactobacillus casei* TISTR 047 ในอาหารสูตรMRS โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พบว่า การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีระยะการเจริญก้าวหน้า (log phase) ในชั่วโมงที่ 12 และเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ในระหว่างชั่วโมงที่ 36 และ 48 แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีการเจริญไม่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047 มีค่าการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 0.85±0.00 รองลงมา คือ *L. plantarum* TISTR 926 มีค่าการเจริญเติบโต เท่ากับ 0.84±0.00 และแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 มีค่าการเจริญต่ำที่สุด เท่ากับ 0.76±0.00 การเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด สอดคล้องกับปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา (ภาพที่ 1) ส่วนการติดตามค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่า มีแนวโน้มเดียวกันมีค่าอยู่ในช่วง 5.32-6.58 ซึ่งค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคเรียแลคติก มีค่าความเป็นกรดด่างภายนอกเซลล์จะช่วยเร่งปฏิกิริยาและเร่งกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.0-7.0 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Silva &Mancilha, 1991)ในการตรวจสอบปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า *L. casei* TISTR 047 และ *L. plantarum* TISTR 050 ผลิตปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 22.16±0.31 และ 22.01±0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 926 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์น้อยที่สุดคิดเป็น 16.91±0.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 2

จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. Casei* TISTR 047 ซึ่งสามารถผลิตปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้มากที่สุดและใกล้เคียงกับ *L. plantarum* TISTR 050 แต่มีการเจริญและผลิตกรดแลคติกสูงกว่า *L. plantarum* TISTR 050 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Torino และคณะ (2001) ในการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ *L. helveticus* ATCC15807 โดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4.5, 5.0 และ 6.2 พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด ที่ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 5.0



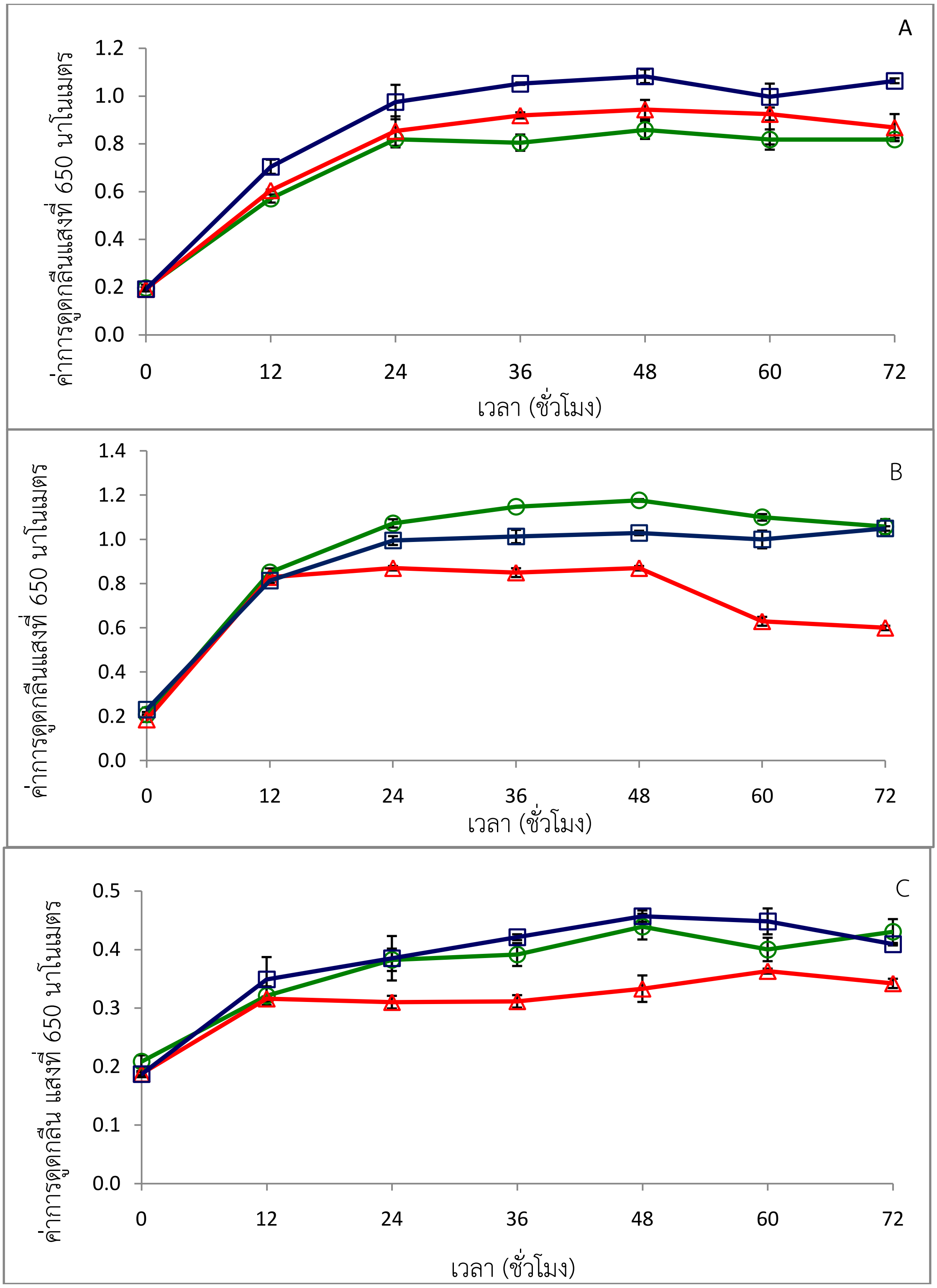
ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติก (A) และความสามารถในการผลิตกรดแลคติก (B) ของเชื้อแบคทีเรีย*L. plantarum* TISTR 926(—△—)*L. plantarum* TISTR 050(—□—)และ *L. casei* TISTR 047 (—○—)ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS



ภาพที่ 2 ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ที่ขับออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *L. Plantarum*TISTR 926( ) *L. plantarum* TISTR 050 ( ) และ *L. casei* TISTR047 ( ) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในระยะ 36 ชั่วโมง

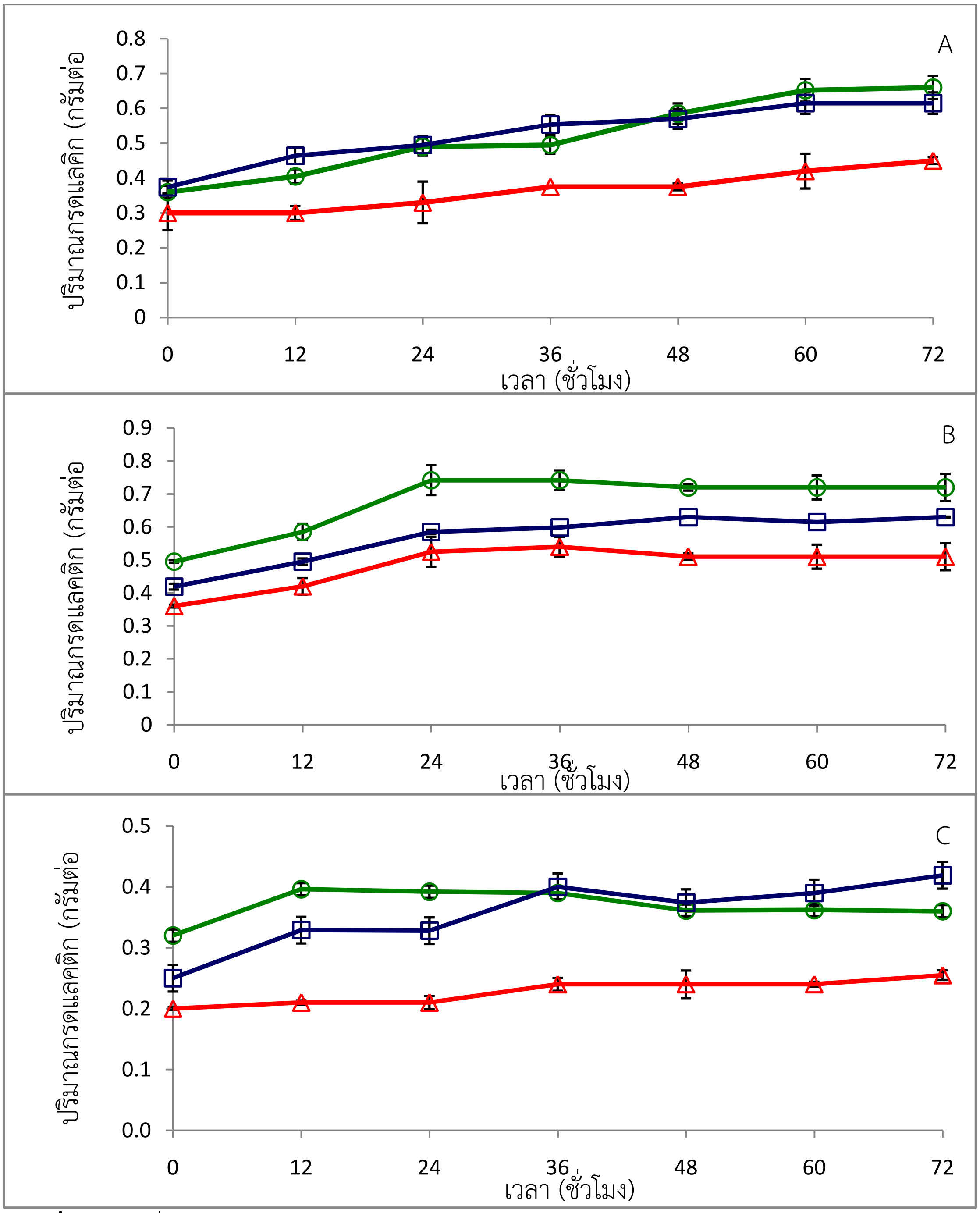
1.2 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 สูตร และเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum*TISTR050, *L. plantarum* TISTR 926 และ *L. casei* TISTR 047 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 MRS (Man และคณะ, 1960), อาหารสูตรที่ 2 BMM (Sanchez และคณะ,2006) และอาหารสูตรที่ 3 SDM (Morishita และคณะ ,1981) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีระยะการเจริญก้าวหน้า (log phase) ในชั่วโมงที่ 12 และเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ในระหว่างชั่วโมงที่ 36 และ 48 และเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 โดย *L. plantarum* TISTR 050 และ *L. casei* TISTR 047 มีค่าการเจริญเติบโตสูงสุดในอาหารสูตรเดียวกัน คือ อาหารสูตรที่ 2 โดยมีค่าการเจริญ เมื่อวัดด้วยสเปกโตรมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 650 นาโนเมตร เท่ากับ 1.28 ± 0.01 และ 1.04 ± 0.00 ตามลำดับ ส่วน *L. plantarum* TISTR 926มีค่าการเจริญสูงสุดในอาหารสูตรที่ 1 มีค่าการเจริญ เท่ากับ 0.94 ± 0.01 ดังแสดงในภาพที่ 3

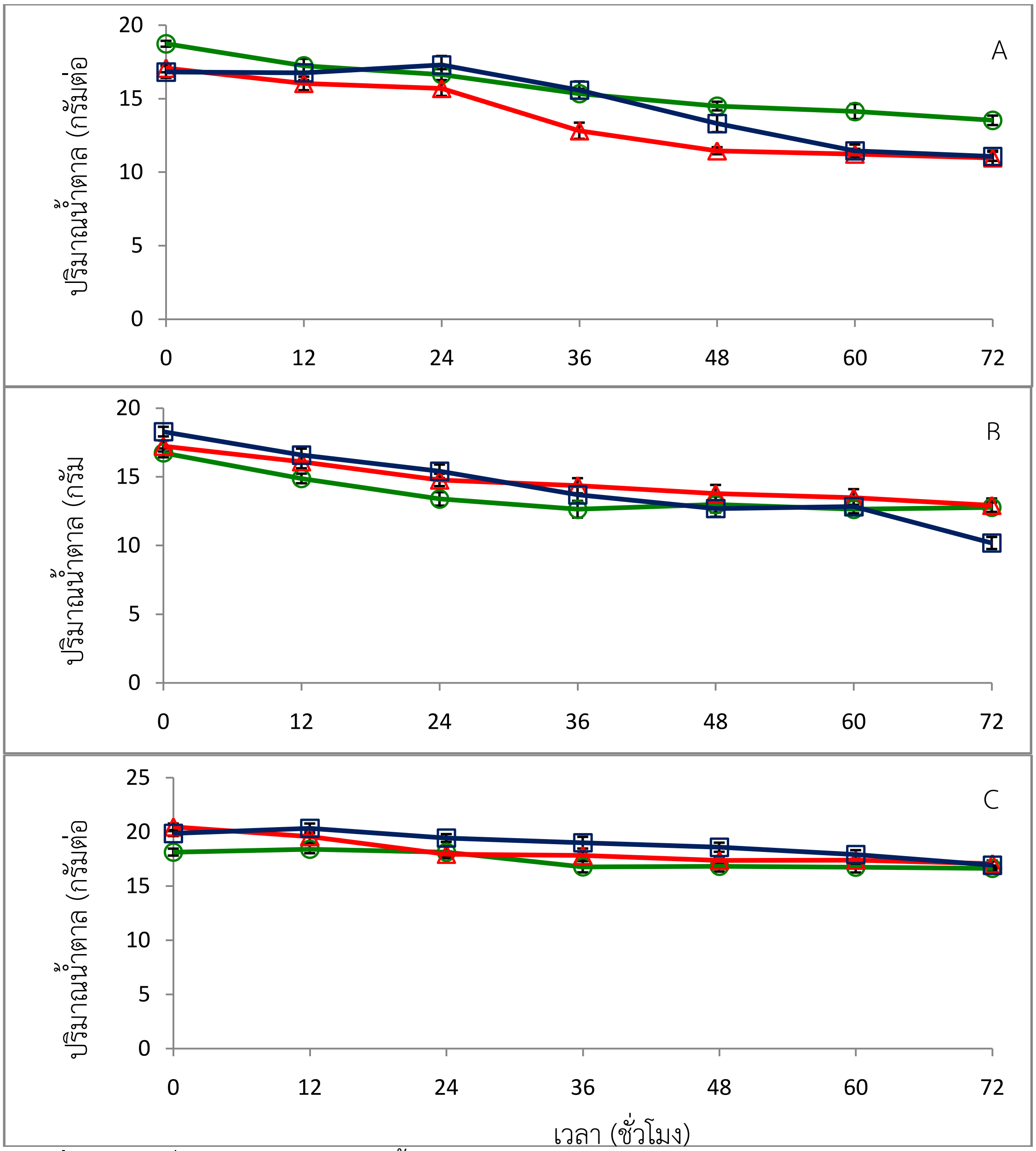


ภาพที่ 3 การเจริญในสูตรอาหาร MRS (A) สูตรอาหาร BMM (B) สูตรอาหาร SDM (C) ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 (—○—), *L. plantarum* TISTR 926 (—△—) *L. casei* TISTR 047 (—□—)

ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง 4.76-6.13 สอดคล้องกับปริมาณกรดแลคติกที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลคงเหลือที่ลดลงตามระยะเวลาในการเลี้ยง (ภาพที่ 4และภาพที่ 5)

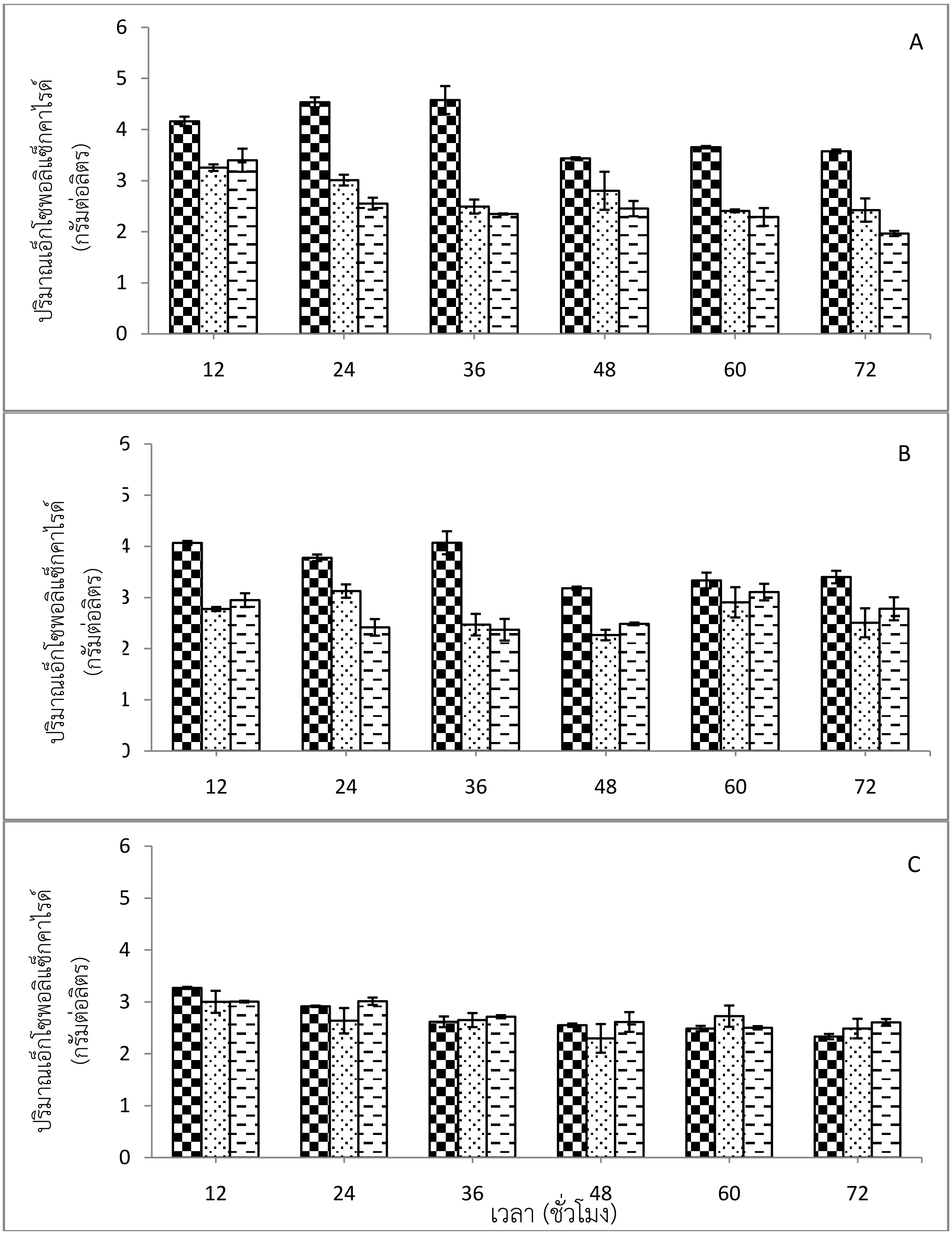


ภาพที่ 4การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในสูตรอาหาร MRS (A) สูตรอาหาร BMM (B) สูตรอาหาร SDM (C) ของเชื้อแบคทีเรีย *L. Plantarum* TISTR 050 ( ) *L. Plantarum* TISTR 926 ( ) และ *L. Casei* TISTR 047 ( )



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลคงเหลือในสูตรอาหาร MRS (A) สูตรอาหาร BMM (B) สูตรอาหาร SDM (C) ของเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum*TISTR 050 ( ) *L. plantarum* TISTR 926 ( ) และ *L. casei* TISTR 047 ( )

เมื่อตรวจสอบปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ในอาหารแต่ละสูตรเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด ที่ระยะเวลาเลี้ยงที่ 12 - 36 ชั่วโมงโดยพบว่า *Lactobacillus casei* TISTR 047 มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดในอาหารสูตรที่ 1 ในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 4.58 $\pm$0.27 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ *L. plantarum* TISTR 050 มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดในอาหารสูตรที่ 1 ที่ระยะเวลาเลี้ยง 12 ชั่วโมง เท่ากับ 3.40$\pm$0.23 กรัมต่อลิตร และ *L. plantarum* TISTR 926 มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด 3.25$\pm$0.06 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเลือก *Lactobacillus casei* TISTR 047 ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 6การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ขับออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารสูตร MRS(A), อาหารสูตร BMM (B) และอาหารสูตร SDM (C) โดยแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 (▦), *L. plantarum* TISTR 926(⁙) และ *L. casei* TISTR 047 (☰)

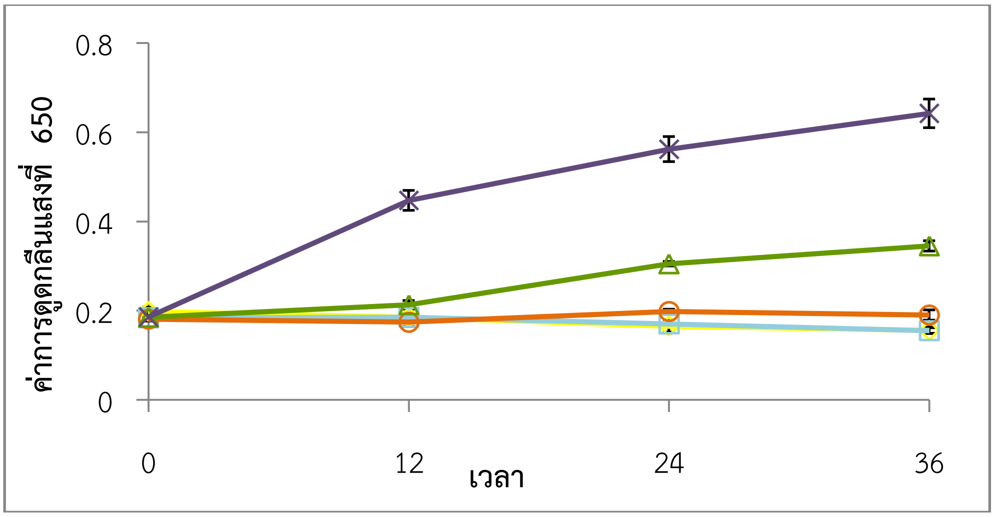
1.2 สภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์

ในการศึกษาค่า พีอชที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งปรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ดังนี้ คือ

สูตรที่ 1 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0
สูตรที่ 2 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5
สูตรที่ 3 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0
สูตรที่ 4 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5
สูตรที่ 5 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* TISTR 047 ในอาหารสูตร MRS ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน โดยตรวจสอบการเจริญ ค่า พีเอช ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล คงเหลือ และปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า การเจริญเติบโตของ เชื้อ *L. casei* TISTR 047ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 มีอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด เท่ากับ 0.64 ±0.04 รองลงมา คือ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 เท่ากับ 0.35 ±0.01 และไม่พบอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0, 4.5 และ 4.0 ดังแสดงในภาพที่ 7 ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 และ 6.0 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง โดย การเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 สามารถผลิตกรดแลคติดได้สูงที่สุด คิดเป็น 0.60 ± 0.00 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตร MRS ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 0.49 ±0.00 กรัมต่อลิตร ส่วนการเลี้ยงในอาหารที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น 4.0 , 4.5 และ 5. 0 พบว่ามีการผลิตปริมาณกรดแลคติกได้น้อย เนื่องจากส ภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่ควบคุมไม่เหมาะสมต่อแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโตจึง ทำให้การผลิตกรดแลคติกได้น้อย ตามระยะเวลาในการเลี้ยงและในส่วนของปริมาณน้ำตาล ที่เหลือลดลงที่ระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น

ในการตรวจสอบปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ในอาหารสูตร MRS ที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 6.0 สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุดคิดเป็น 4.86 ±0.15 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ การเลี้ยงที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 สามารถผลิต เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ คิดเป็น 4.59 ±0.27 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 4.5 และ 4.0 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ ใกล้เคียงกัน คิดเป็น 3.8±0.06, 3.30±0.04 และ3.04±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 การเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRSที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน

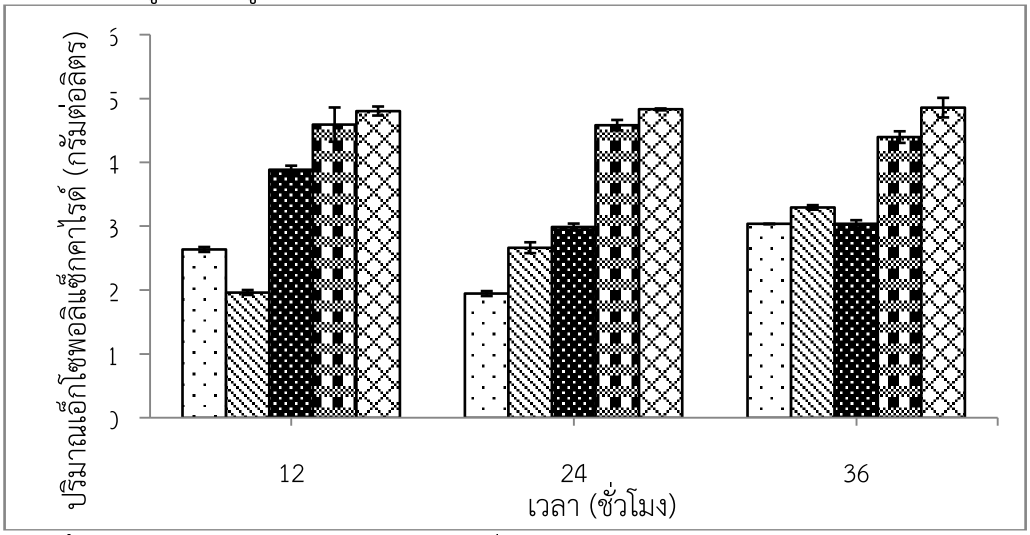
สูตรที่ 1 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 ( )

สูตรที่ 2 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 ( )

สูตรที่ 3 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ( )

สูตรที่ 4 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 ( )

สูตรที่ 5 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ( )



ภาพที่ 8 การผลิต เอ็กโซพอลิแซ็กคา ร์ไรด์ที่ขับออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 047ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน โดย

สูตรที่ 1 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 ( )

สูตรที่ 2 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 ( )

สูตรที่ 3 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0( )

สูตรที่ 4 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 ( )

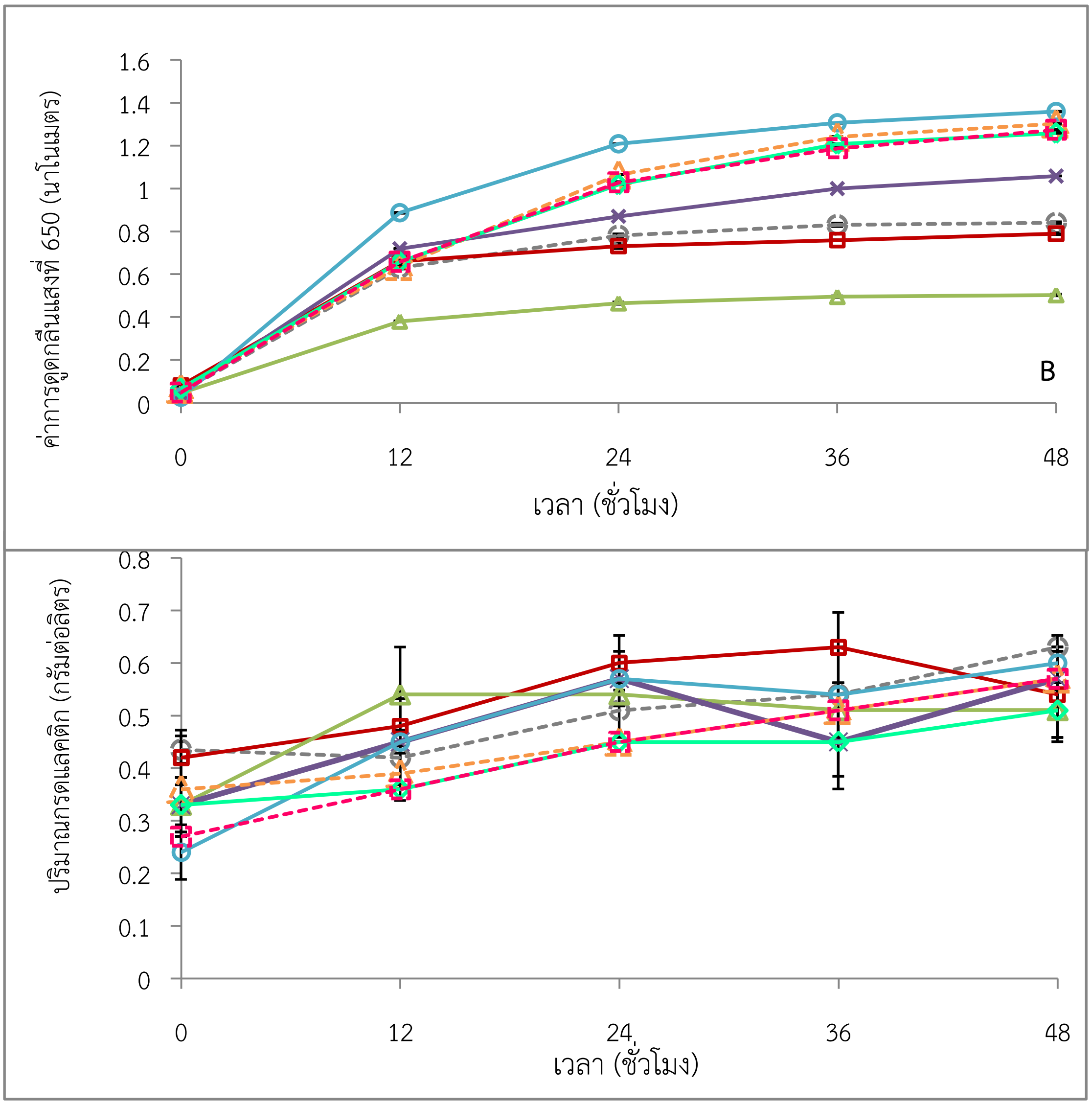
สูตรที่ 5 สูตรอาหาร MRS + ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ( )

ตอนที่ 2 การศึกษาน้ำตาลที่เหลือจากผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายออสโมติก ในรูปแบบสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส เพื่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์

จากการโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เงาะ กึ่งแห้งเพื่อสุขภาพ มีส่วนเหลือคือ น้ำเชื่อมที่เหลือจากการผลิตเงาะกึ่งแห้ง อยู่ในรูปสารละลายออสโมติกผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรค์ได้นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนโดยศึกษาความเข้มข้นของน้ำเชื่อมที่เหลือจากการผลิตเงาะกึ่งแห้ง เพื่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047 โดยทดลองดัดแปลงแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลจำนวน 7 สูตร และใช้การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นชุดควบคุม ซึ่งอาหาร 7 สูตร ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 คือ น้ำตาลซูโครส (ร้อยละ 50)
สูตรที่ 2 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 50)
สูตรที่ 3 คือ น้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 5: 45)
สูตรที่ 4 คือ น้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 10: 40)
สูตรที่ 5 คือ น้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 15: 35)
สูตรที่ 6 คือ น้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 20: 30)
สูตรที่ 7 คือ น้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 25: 25)

จากการศึกษาการเลี้ยง *L. casei* TISTR 047 ในอาหารทั้ง 7 สูตร มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 4 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 10: 40) มีค่าการเจริญเติบโตสูงสุด ส่วนการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 5, 6, 7 และ 3 มีค่าการเจริญไม่แตกต่างกัน ส่วนอาหารสูตรที่ 2 มีการเจริญต่ำที่สุด (ภาพที่ 9) สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อระยะเวลา การเลี้ยงเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน โดยการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 10: 40) สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด คิดเป็น 0.60±0.05 กรัมต่อลิตร ส่วนสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 5: 45) สูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 15: 35) อาหารสูตรที่ 7 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 25: 25) และอาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียวผลิตกรดแลคติกมีค่าใกล้เคียงกันส่วนอาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียวและอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 20: 30) สามารถผลิตกรดแลคติกได้น้อยที่สุด (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโต (A) และความสามารถในการผลิตกรดแลคติก (B) ของเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง โดยชุดควบคุม MRS (--◯--)

สูตรที่ 1 ซูโครส (ร้อยละ 50) (—□—)

สูตรที่ 2 โอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 50) (—△—)

สูตรที่ 3 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (5: 45) (—✕—)

สูตรที่ 4 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (10: 40) (—◯—)

สูตรที่ 5 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (15: 35) (--△--)

สูตรที่ 6 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (20: 30) (—◇—)

สูตรที่ 7 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (25: 25) (--□--)

ในการตรวจสอบการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นการเลี้ยงด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ 49.92±0.66 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นการเลี้ยงด้วยน้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 32.81±1.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเลี้ยงใน

แหล่งคาร์บอนแบบน้ำตาลผสมสูตรที่ 6 สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 25.90±6.24 มิลลิกรัมต่อลิตร การเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนแบบน้ำตาลผสมสูตรที่ 7และสูตรที่ 3ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ใกล้เคียงกัน 19.57±0.00 และ 19.13±1.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ การเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนแบบน้ำตาลผสมสูตรที่ 4 สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 16.71±0.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนแบบน้ำตาลผสมสูตรที่ 5 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด คือ 13.74±0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 10) จากวิธีการที่ได้ศึกษาข้างต้นพบว่า แบคทีเรียสามารถผลิต เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากโอลิโกแซ็กคาไรด์มีความเป็นพรีไบโอติก สามารถกระตุ้นการผลิตกรดและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ซึ่งเป็นโพรไบโอติก จึงสามารถย่อยโอลิโกแซ็กคาไรด์และสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้มาก (Seah Young Ng และคณะ,2014) และจากรายงานการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส กาแล็กโทส และแล็กโทส พบว่า *B. megaterium* และ *B. polymyx* สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Himanslm และคณะ, 1997; Lee และคณะ,1997) ดังนั้น จึงเลือกอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นการเลี้ยงด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้ปริมาณสูงที่สุด ทั้งนี้ในการเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจะมีความแตกต่างออกไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์นั้นๆ เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในกระบวนการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

ตอนที่ 3 การใช้สารอาหารราคาถูกที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ทดแทนอาหารสังเคราะห์

3.1 การใช้น้ำมะพร้าวที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร มาเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมะพร้าว เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* TISTR 047 โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลง MRS ซึ่งเติมความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่แตกต่างกัน ดังนี้

สูตรที่ 1 คือ น้ำมะพร้าว + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)

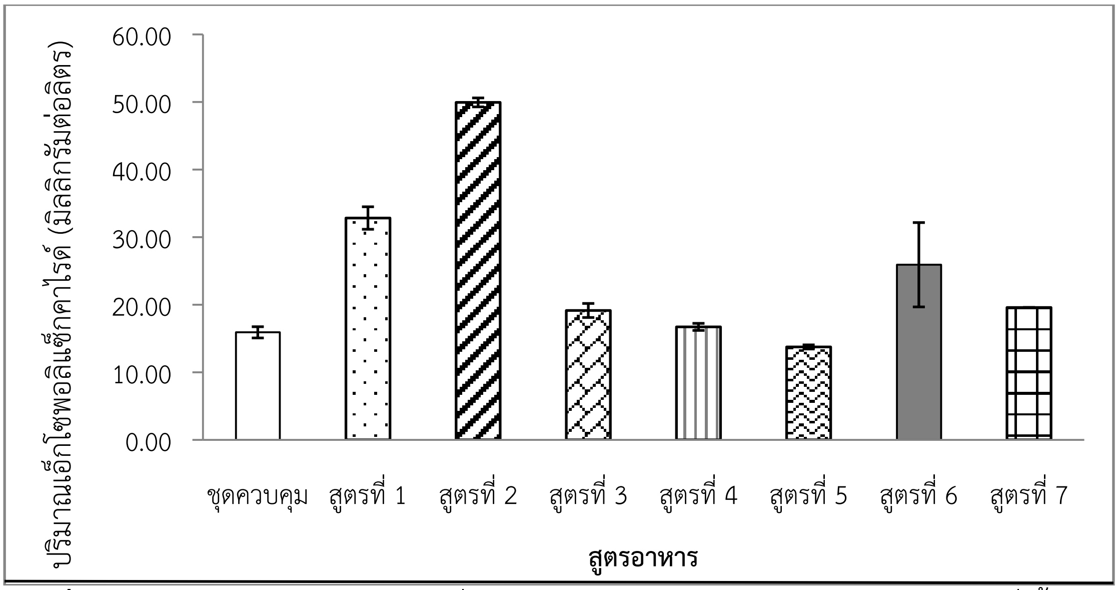
สูตรที่ 2 คือ น้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 20: 80) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)

สูตรที่ 3 คือ น้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 40: 60) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)

สูตรที่ 4 คือ น้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 60: 40) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)

สูตรที่ 5 คือ น้ำกรอง + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)

สูตรที่ 6 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)



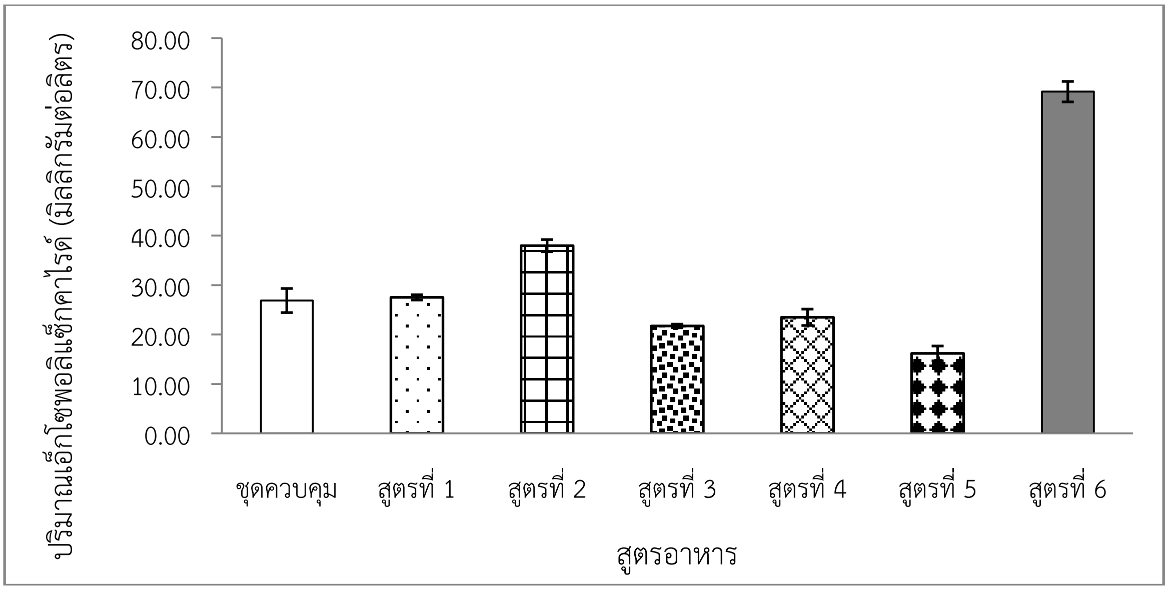
ภาพที่ 10 ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ขับออกภายนอกเซลล์ของ *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรMRS ดัดแปลง ในระยะ 48 ชั่วโมง โดย

ชุดควบคุม MRS ( )
สูตรที่ 1 ซูโครส (ร้อยละ 50 ( )
สูตรที่ 2 โอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 50) ( )
สูตรที่ 3 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (5: 45) ( )
สูตรที่ 4 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (10: 40) ( )
สูตรที่ 5 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (15: 35) ( )
สูตรที่ 6 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (20: 30) ( )
สูตรที่ 7 ซูโครส : โอลิโกแซ็กคาไรด์ (25: 25) ( )

ในการเลี้ยงใช้อาหารสูตร MRS เป็นชุดควบคุม ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยตรวจสอบการเจริญ ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ และค่าความเป็นกรดด่างพบว่า *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง MRS โดยใช้น้ำมะพร้าวมาเป็นแหล่งคาร์บอน มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยอาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 20: 80) มีค่าการเจริญเติบโตสูงสุด รองลงมาคือ อาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียว อาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำกรองเพียงอย่างเดียว อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 40: 60) อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 60: 40) และอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) มีค่าเจริญต่ำที่สุด ตามลำดับ และปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น โดยการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 20: 80) สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด 0.77±0.09 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียว สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 0.75±0.05 กรัมต่อลิตร ส่วนสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 40: 60) อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ

60: 40) 0.63±0.00 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ซึ่งมีปริมาณกรดแลคติกที่ใกล้เคียงกัน และอาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำกรองเพียงอย่างเดียว มีปริมาณกรดแลคติกน้อยที่สุด

ในการตรวจสอบการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ พบว่า การเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาร์ไรด์สูงสุด เท่ากับ 69.18±2.07 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ สูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 20: 80) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ 38.01±1.23 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนอาหารสูตรที่ 1 เลี้ยงด้วยน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียวผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 27.54±0.54 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 60: 40) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 23.50±1.66 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 40: 60) สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ 21.75±0.37 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 5 ใช้น้ำกรองในการละลายอาหาร MRS ดัดแปลงเพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้น้อยที่สุด เท่ากับ 16.19±1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ขับออกภายนอกเซลล์ ของ *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง ในระยะ 48 ชั่วโมง โดย

ชุดควบคุม MRS ( )
สูตรที่ 1 น้ำมะพร้าว + MRS (ไม่ใส่กลูโคส) ( )
สูตรที่ 2 น้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 20: 80) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส) ( )
สูตรที่ 3 น้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 40: 60) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส) ( )
สูตรที่ 4 น้ำกรองต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 60: 40) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส) ( )
สูตรที่ 5 น้ำกรอง + MRS (ไม่ใส่กลูโคส) ( )
สูตรที่ 6 โอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) + MRS (ไม่ใส่กลูโคส)( )

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด เนื่องจากได้รับแหล่งคาร์บอน จากน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำมะพร้าว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Unagul และคณะ (2007) พบว่าในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตส 6.1 กรัมต่อลิตร และซูโครส 6.7 กรัมต่อลิตร) มีธาตุอาหารและแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ และสอดคล้องกับรายงานของ Cerning และคณะ (1994) ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus casei* CG11 โดยเลี้ยงในอาหารดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กาแล็กโทส กลูโคส แล็กโทส ซูโครส มอลโทส และเมลิไบโอส พบว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีปริมาณมวลเซลล์น้อย แต่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้มากที่สุด ดังนั้น จึงเลือกอาหารสูตรที่ 6 มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้ปริมาณสูงที่สุด

3.2 การใช้น้ำเชื่อมที่เหลือจากการผลิตเงาะกึ่งแห้งและน้ำมะพร้าว เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเหลือทิ้งจาก การผลิตเงาะกึ่งแห้ง และน้ำมะพร้าวในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* TISTR 047 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทดลองดัดแปลงแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วยน้ำเชื่อมและน้ำมะพร้าว จำนวน 6 สูตร และใช้การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นชุดควบคุม ซึ่งอาหารทั้ง 6 สูตร ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 50)

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (5:45)

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (10:40)

สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (15:35)

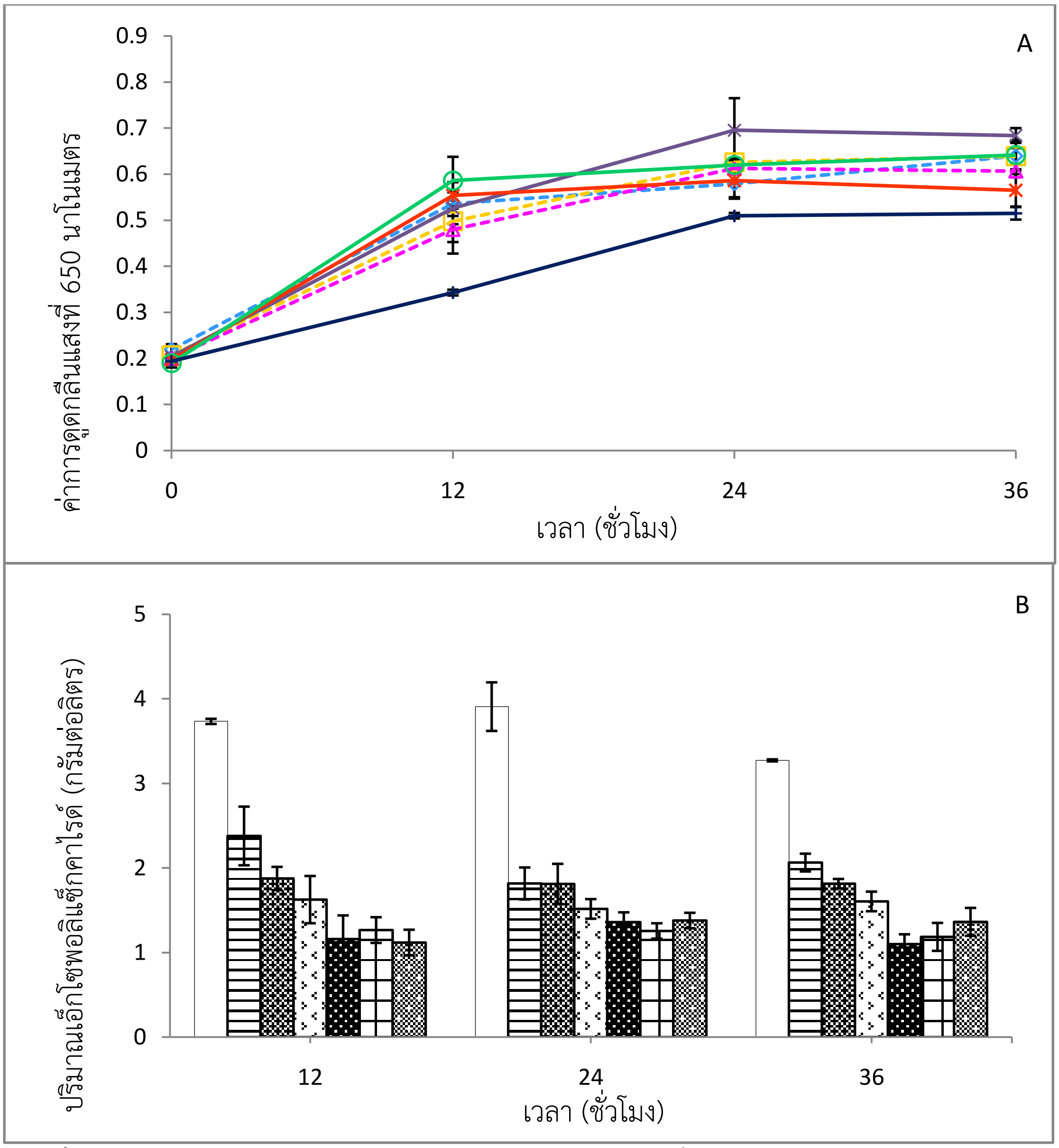
สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (20:30)

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (25:25)

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารทั้ง 6 สูตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยตรวจสอบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์พบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 36 โดย *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 15: 35) มีค่าเจริญเติบโตสูงสุด 0.70 $\pm$0.03 ทั้งนี้การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ โดยใช้น้ำตาลต่างชนิดกัน ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารนั้นๆ ที่เป็นแหล่งในการแยกเชื้อในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยอาหารสูตรที่ 6, 2 และ 3 มีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน ส่วนอาหารสูตรที่ 5 มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด เท่ากับ 0.59 $\pm$0.02 ดังแสดงในภาพที่ 12 ในส่วนของปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น และมีค่าใกล้เคียงกัน โดยการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 15: 35) สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุดคิดเป็น 0.48$\pm$0.00 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการรายงานของ YoungNg และคณะ (2014) ในศึกษาความเป็นพรีไบโอติกของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่สามารถกระตุ้นการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *L.*

acidophilus และ *L. casei* พบว่าปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นพร้อมระยะเวลาในการเจริญในระหว่างการหมัก ส่วนสูตรอาหารที่ 2 ประกอบด้วยน้ำ มะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (ร้อยละ 5:4 5) อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำ มะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (ร้อยละ 10:40) อาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วย น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียว และอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 25:2 5) ผลิตกรดแลคติกที่มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนอาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (ร้อยละ 20:30) ผลิตกรดแลคติกได้น้อยที่สุด คิดเป็น 0.38 ±0.00 กรัมต่อลิตร ในส่วนของปริมาณน้ำตาล คงเหลือมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นและอัตราการลดลงของปริมาณน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ที่ใช้ในการเลี้ยง

ในการตรวจสอบการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ พบว่า อาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์เพียงอย่างเดียวผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้สูงที่สุด 2.38 ±0.35 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคา ร์ไรด์ (ร้อยละ15: 35) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้ 1.88 ±0.3 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (ร้อยละ 10:40) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้ 1.63 ± 0.14 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 25 :25)ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ 1.38±0.34 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (ร้อยละ 15:35) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 1.36±0.12 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (ร้อยละ 20:30) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้น้อยที่สุด 1.27±0.16 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การเจริญของเซลล์ (A) ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047 (B) ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลง โดยชุดควบคุม MRS (—+—) (□)

สูตรที่ 1 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 50) (--◇--), (▤)

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (5:45) (--□--), (▩)

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (10:40) (--△--, (▨)

สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (15:35) (—×—), (■)

สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (20:30) (—✳—), (▣)

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (25:25) (—○—), (▩)

3.3 การใช้น้ำมะพร้าวและน้ำตาลทรายแดง เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวและน้ำตาลทรายแดง เพื่อผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ *L. casei* TISTR 047 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทดลองดัดแปลงแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวและน้ำตาลทรายแดง จำนวน 6 สูตร และใช้การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นชุดควบคุม ซึ่งอาหาร 6 สูตร ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 คือ น้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 50)

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (5:45)

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (10:40)

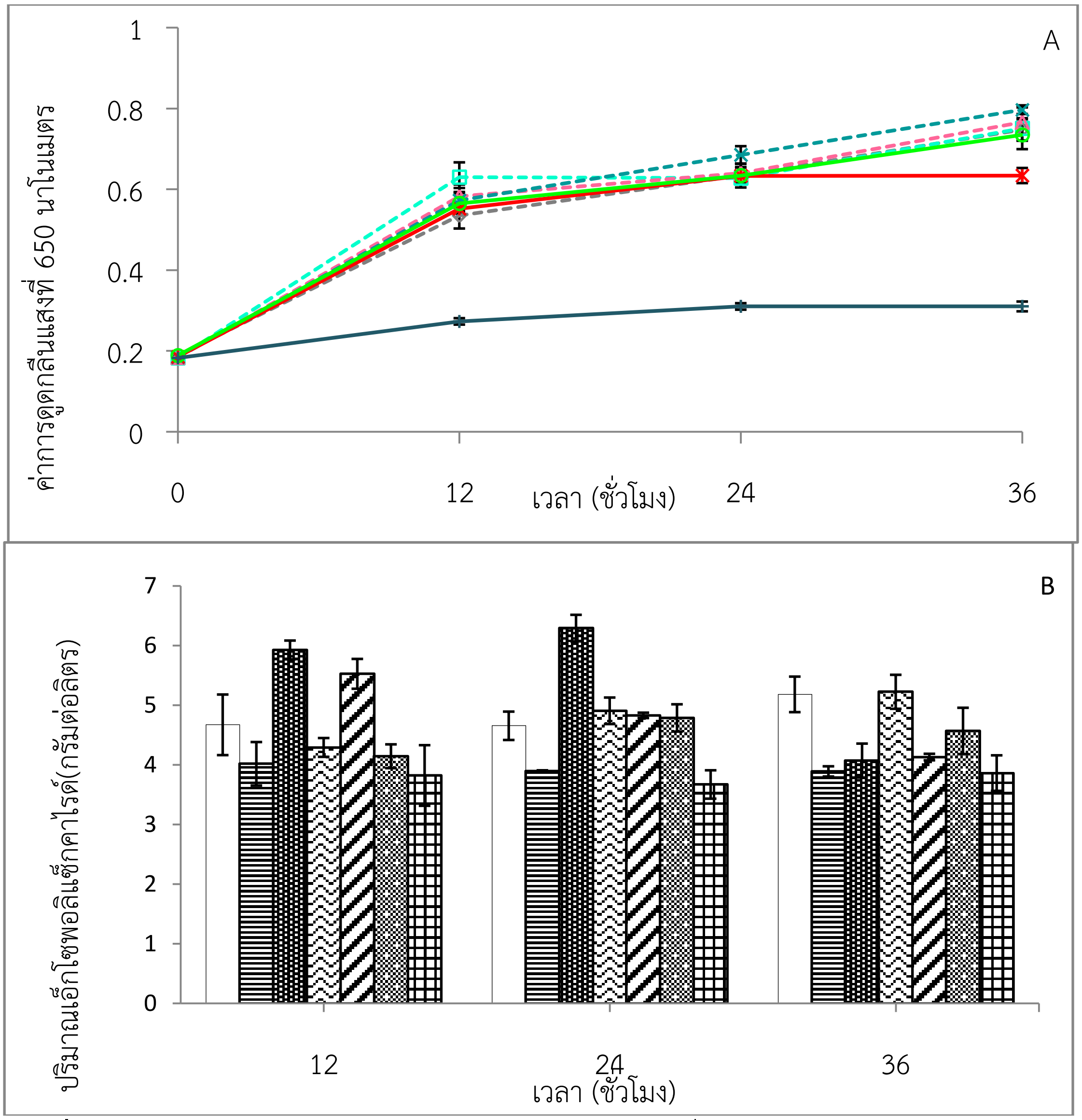
สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (15:35)

สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (20:30)

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (25:25)

ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารทั้ง 6 สูตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยตรวจสอบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลคงเหลือและปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ พบว่า *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 15: 35) มีค่าเจริญเติบโตสูงที่สุด เท่ากับ 0.80 $\pm$0.01 รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 10:40) สูตรอาหารที่ 1 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดงเพียงอย่างเดียว สูตรอาหารที่ 2 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 5:45) สูตรอาหารที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ25:25) มีค่าการเจริญใกล้เคียงกัน และสูตรอาหารที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 20: 30) มีค่าการเจริญเติบโตต่ำที่สุด เท่ากับ 0.63 $\pm$0.01 ดังแสดงในภาพที่ 13 ในส่วนของปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง อีกทั้งปริมาณน้ำตาล คงเหลือที่วัดได้มีปริมาณแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

ในการตรวจสอบการผลิตปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า สูตรอาหารที่ 2 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 5:45) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด คิดเป็น 6.29$\pm$0.01 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ15:35) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 5.54$\pm$0.25 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ร้อยละ 10 :40) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 5.23$\pm$0.29 กรัมต่อลิตร ส่วนของอาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 20 :30) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 4.79$\pm$0.23 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตาลทรายแดงเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 15 :35)ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 4.02$\pm$0.36 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 25:25) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด 3.86$\pm$0.17 กรัมต่อลิตร (ภาพที่13) จากวิธีการข้างต้นที่ได้ศึกษา พบว่า สูตรอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมะพร้าวและน้ำตาลทรายแดงสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ เนื่องจากน้ำตาลทรายจะมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้



ภาพที่ 13 การเจริญของเซลล์ (A) ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047(B) ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลง โดยชุดควบคุม MRS (), ()

สูตรที่ 1 คือ น้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 50) (), ()

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (5:45) (), ()

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (10:40) (), ()

สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (15:35) (), ()

สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (20:30) (), ()

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อน้ำตาลทรายแดง (25:25) (), ()

3.4 การใช้น้ำมะพร้าวและกลูโคสไซรัป เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

จาก การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวและกลูโคสไซรัป เพื่อผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ของ *L. casei* TISTR 047 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทดลองดัดแปลงแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวและกลูโคสไซรัป จำนวน 6 สูตร และใช้การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นชุดควบคุม ซึ่งอาหาร 6 สูตร ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 คือ กลูโครสไซรัป (ร้อยละ 50)

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (5:50)

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (10:40)

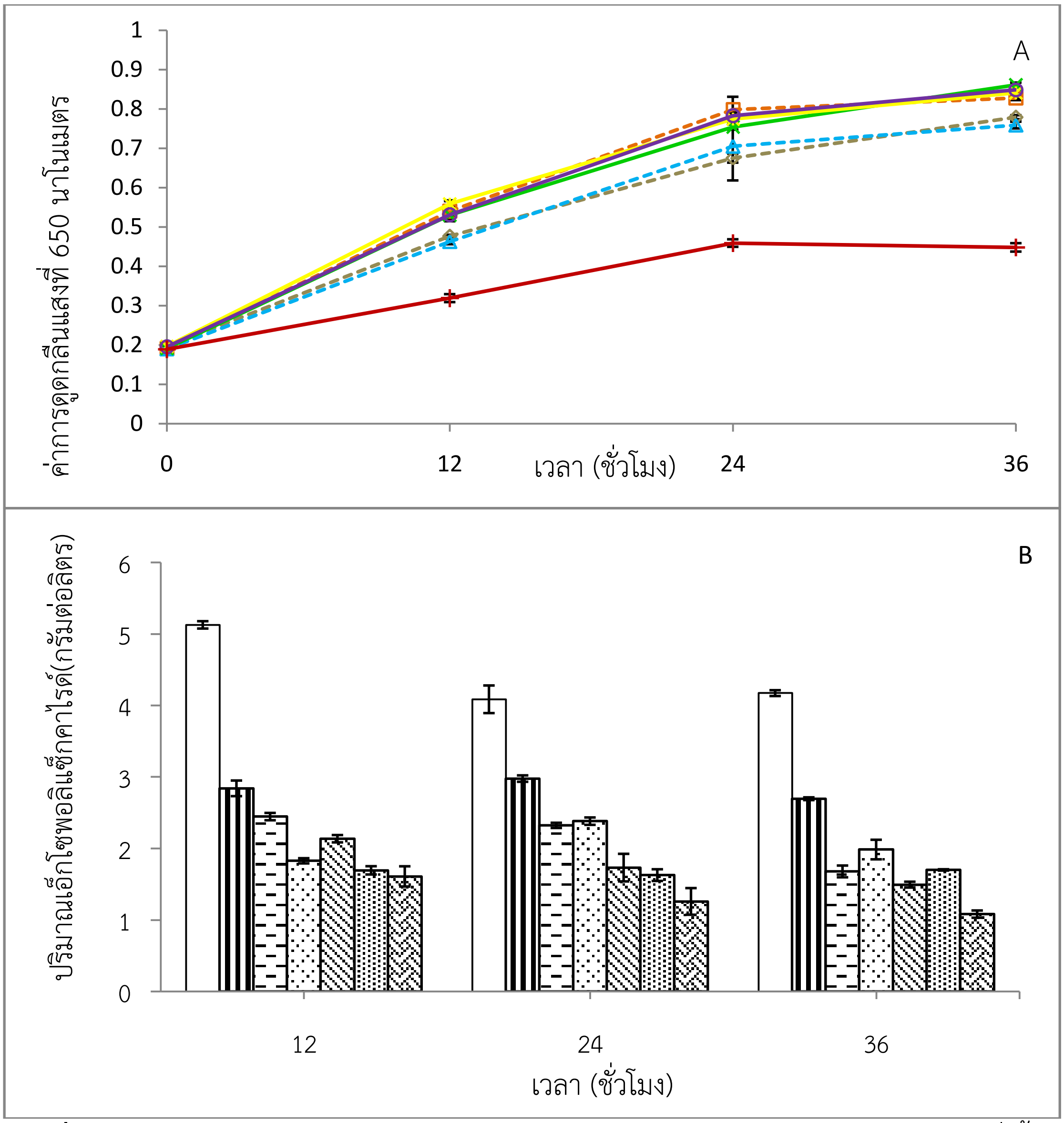
สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (15:35)

สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (20:30)

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (25:25)

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารทั้ง 6 สูตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยตรวจสอบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ดังแสดงในภาพที่ 14 พบว่า *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 15: 35) มีค่าเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 0.86$\pm$0.02 รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 25:25) สูตรอาหารที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 20:30) สูตรอาหารที่ 2 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 5: 45) และสูตรอาหารที่ 1 ประกอบด้วกลูโคสไซรัปเพียงอย่างเดียว มีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน ส่วนสูตรอาหารที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 10:40) มีค่าเจริญต่ำที่สุด เท่ากับ 0. 76$\pm$0.03 และปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นและมีค่าไม่แตกต่างกัน

ในการตรวจสอบปริมาณการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ พบว่า สูตรอาหารที่ 1 ประกอบด้วยน้ำกลูโคสไซรัปเพียงอย่างเดียว ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้มากที่สุด 2.98$\pm$0.04 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ5:4 5) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้ 2.45 $\pm$0.05 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อ กลูโคสไซรัป (ร้อยละ 10:40) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้ 2.38 $\pm$ 0.05 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 15:35) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้ 2.14$\pm$ 0.05 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อ กลูโคสไซรัป (ร้อยละ 20 :30) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้ 1.70 $\pm$ 0.01 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (ร้อยละ 25 :25) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาร์ไรด์ได้น้อยที่สุด คิดเป็น 1.61 $\pm$ 0.14กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 การเจริญของเซลล์ (A) ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* TISTR 047(B) ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลง โดยชุดควบคุม MRS ( ) ( ),

สูตรที่ 1 คือ กลูโคสไซรัป (ร้อยละ 50) ( ) ( )

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (5:45) ( ), ( )

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (10:40) ( ), ( )

สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (15:35) ( ), ( )

สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (20:30) ( ), ( )

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อกลูโคสไซรัป (25:25)( ),( )

3.5 การใช้น้ำมะพร้าวและเด็กทรินซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวและเด็กทรินซ์เพื่อผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* TISTR 047 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทดลองดัดแปลงแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวและเด็กทรินซ์จำนวน 6 สูตร และใช้การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นชุดควบคุม ซึ่งอาหาร 6 สูตร ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 คือ เด็กทรินซ์(ร้อยละ 50)

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(5:50)

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(10:40)

สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(15:35)

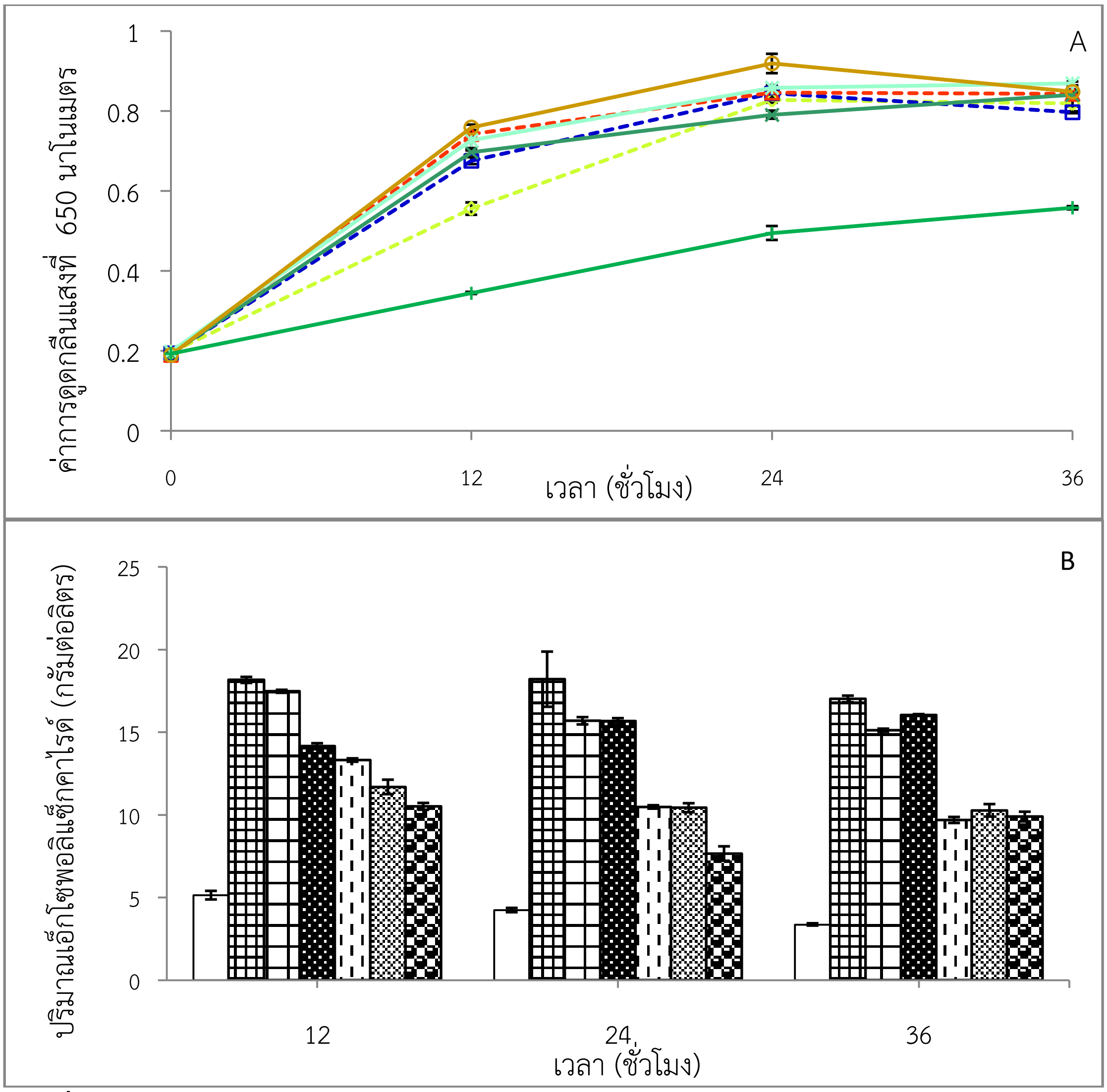
สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(20:30)

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(25:25)

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารทั้ง 6 สูตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยตรวจสอบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล คงเหลือและปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์ (ร้อยละ 25:2 5) มีค่าเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 0.92 ±0.01 รองลงมาคือ สูตรอาหารที่ 5 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(ร้อยละ 20:30) ส่วนการเลี้ยงด้วย สูตรอาหารที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(ร้อยละ 10:40) สูตรอาหารที่ 2 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(ร้อยละ 5:45) และสูตรอาหารที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์ (ร้อยละ 15:35) มีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน ส่วนการเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 1 ประกอบด้วยเด็กทรินซ์เพียงอย่างเดียว มีค่าเจริญต่ำที่สุด เท่ากับ 0.83 ±0.01 (ภาพที่ 15) โดยการสร้าง ปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นและมีค่าไม่แตกต่างกัน

ในการตรวจสอบการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า สูตรอาหารที่ 1 ประกอบด้วยเด็กทรินซ์เพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคา ร์ไรด์ได้คิดเป็น 18.20 ±1.67 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(ร้อยละ5:45) สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 17.47±0.09 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อ เด็กทรินซ์ (ร้อยละ 10 :40) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 16.04 ± 0.05 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อ เด็กทรินซ์ (ร้อยละ 15 :35) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ คิ ดเป็น 13.31 ± 0.10 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารสูตรที่ 5ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อ เด็กทรินซ์ (ร้อยละ 20:30) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 11.68± 0.44 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์ (ร้อยละ 25:25) ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด 10.51± 0.21 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 15) จากการศึกษาการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่มีส่วนผสมของน้ำมะพร้าวและเด็กทรินซ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด ในอาหารที่ประกอบด้วยเด็กทรินซ์เพียงอย่างเดียว แต่มีปริมาณของมวลเซลล์ในการเจริญน้อยที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Cerning และคณะ (1994) ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* CG11 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส

กาแล็กโทส แลกโทส ซูโครส มอลโทส และเมลิไบโอส พบว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีปริมาณมวลเซลล์น้อย แต่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด



ภาพที่ 15 การเจริญของเซลล์ (A) ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047(B) ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลง โดยชุดควบคุม MRS (—+—), (□)

สูตรที่ 1 คือ เด็กทรินซ์(ร้อยละ 50) (- - -◇- - -, (▦)

สูตรที่ 2 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(5:50) (- - □ - - , (⊞)

สูตรที่ 3 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(10:40) (- - △ - -), (▩)

สูตรที่ 4 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(15:35) (—×—), (⬚)

สูตรที่ 5 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(20:30) (—✳—), (▒)

สูตรที่ 6 คือ น้ำมะพร้าวต่อเด็กทรินซ์(25:25) (—○—), (▣)

3.6 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

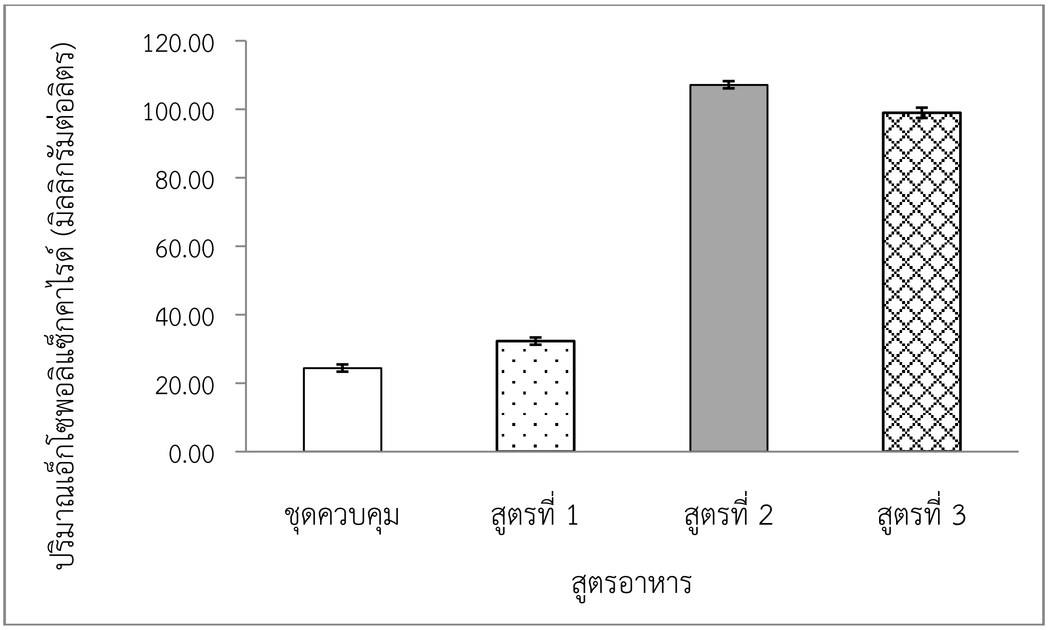
ในการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ *L. casei* TISTR 047 โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลง MRS ทั้ง 3 สูตร และใช้การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50)

สูตรที่ 2 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ เพปโตน สารสกัดจากเนื้อและสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 50

สูตรที่ 3 คือ น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ เพปโตน สารสกัดจากเนื้อและสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 25

ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการเจริญ ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า มวลเซลล์มีการเจริญได้น้อยกว่าการเลี้ยงในชุดควบคุมด้วยอาหาร MRS ทั้ง 3 สูตร โดยอาหารสูตรที่ 1อาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรที่ 3 มีมวลเซลล์ใกล้เคียงกัน เมื่อตรวจสอบการผลิตกรดแลคติก พบว่า อาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ เพปโตน สารสกัดจากเนื้อ และสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 50 และอาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ เพปโตน สารสกัดจากเนื้อและสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 25 มีปริมาณกรดแลคติกใกล้เคียงกัน ส่วนอาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) มีปริมาณกรดแลคติกน้อยที่สุด แต่ในอาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน ร้อยละ 50 มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คิดเป็น 107.17±1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน ร้อยละ 25 มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์คิดเป็น 98.98±1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 1 ประกอบ ด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) ซึ่งมีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์น้อยที่สุด คิดเป็น 32.28±1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 16) จากศึกษาพบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ ใกล้เคียงกับรายงานของ Kuntiya และคณะ (2001) ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus confuses* CMU 198 ในอาหารสูตรดัดแปลง MRS โดยใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำปราศจากไอออนและลดปริมาณแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เพปโตน สารสกัดจากเนื้อ และสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 0, 25, 50, 75 และ 100 พบว่า การลดแหล่งไนโตรเจนที่ร้อยละ 50 แบคทีเรียสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด คิดเป็น 11.7 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 16 ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง ในระยะ 48 ชั่วโมงโดยชุดควบคุม MRS (□)

สูตรที่ 1 โอลิโกแซ็กคาไรด์ : น้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) (⁘)

สูตรที่ 2 โอลิโกแซ็กคาไรด์ : น้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) + MRS ดัดแปลง (ลดไนโตรเจน ร้อยละ 50) (■)

สูตรที่ 3 โอลิโกแซ็กคาไรด์ : น้ำมะพร้าว (ร้อยละ 50: 50) + MRS ดัดแปลง (ลดไนโตรเจน ร้อยละ 25) (⊠)

ตอนที่ 4 การศึกษาวิธีการแยกบริสุทธิ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์สูงที่สุด

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในสภาวะที่ปรับสารอาหารต่างๆ ให้มีความเหมาะสม เพื่อผลิตสารเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ โดยศึกษาวิธีการสกัด ตลอดจนชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายเพื่อตกตะกอนพอลิเมอร์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lin & Chang Chien (2007), Duenas, และคณะ (2003) และ Smitinont และคณะ (1999) ตรวจสอบกรดอินทรีย์ และชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ด้วย HPLC ดัดแปลงจากวิธีการของ Yang และคณะ (2005)

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมด

4.1.1 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีแอนโทรน (ดัดแปลงจาก Dreywood,1946)

การทดสอบการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีแอนโทรน จากตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* TISTR 047 ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำส่วนใสจากน้ำหมักมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น นำมาเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรน พบว่าได้ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 15.58 ± 0.16 กรัมต่อลิตร

และสามารถวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอทานอลตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกแล้วในอัตราส่วน 1: 1 โดยนำตะกอนที่ได้มาเติมกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรน พบว่าได้ค่าของน้ำตาลเท่ากับ 0. 15 ± 0.0 3 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำตาลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีแอนโทรน

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
น้ำหมัก 48 ชั่วโมง	15.58 ± 0.16
เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สกัดโดยเอทานอลอัตราส่วน 1: 1	0.15 ± 0.03

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

จากการสังเกตในขณะทำการทดลองพบว่า สารละลายแอนโทรนเป็นสารที่มีสภาพไม่คงตัว โดยสังเกตเห็นได้จากสีที่แตกต่างกันเมื่อเก็บรักษาอีกทั้งมีงานวิจัยหลายฉบับที่ทำการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีแอนโทรนที่มีการดัดแปลงขั้นตอนที่แตกต่าง ดังนั้น จึงทำการแก้ไขปัญหาโดยการตรวจสอบสภาวะต่างๆ ในการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารละลายแอนโทรนที่เตรียม ปริมาตรของสารละลายแอนโทรน และอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างทำการวิเคราะห์

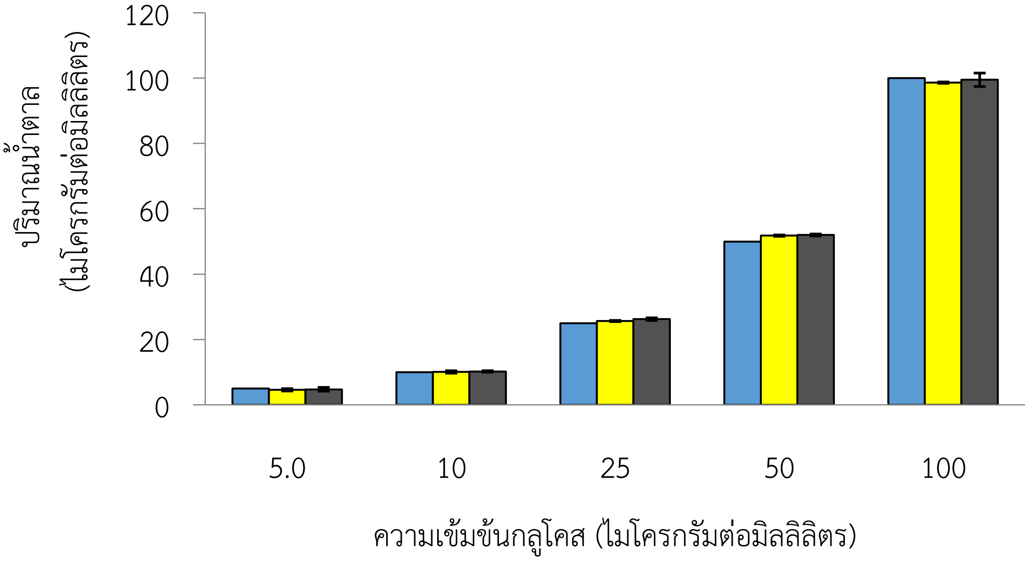
1) ระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารละลายแอนโทรน

ในการเตรียมสารละลายแอนโทรนพบว่า สารละลายแอนโทรนที่ถูกเตรียมใหม่จะมีสีเหลืองอ่อนเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จะมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มขึ้น จึงทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้สารละลายแอนโทรนที่ถูกเตรียมในระยะเวลาต่างกัน พบว่าสามารถวัดค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 และเปรียบเทียบค่าปริมาณของน้ำตาลกลูโคสได้ดังแสดงในภาพที่ 17 ดังนั้นจากการทดสอบในเบื้องต้นพบว่าสารละลายแอนโทรนมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่เก็บรักษาจึงควรเตรียมสารละลายแอนโทรนให้เพียงพอต่อการใช้งานในแต่ละครั้งเพื่อสะดวกต่อการทดลองของผู้ใช้

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	แอนโทรนเตรียมใหม่	แอนโทรนเตรียม 24 ชั่วโมง
5	4.57± 0.36	4.75 ± 0.57
10	10.05± 0.37	10.20 ± 0.23
25	25.64± 0.18	26.21 ± 0.40
50	51.77± 0.21	51.97 ± 0.30
100	98.62±0.21	99.49 ± 2.06

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 17 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการทดสอบกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้สารละลายแอนโทรนที่ถูกเตรียม 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารละลายแอนโทรนที่เตรียมใหม่ โดยความเข้มข้นมาตรฐานของกลูโคส ( ) ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างโดยใช้สารละลายแอนโทรนเตรียมใหม่ ( ) ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างโดยใช้สารละลายแอนโทรน 24 ชั่วโมง ( )

2) ปริมาตรของสารละลายแอนโทรนที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

จากการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยการวัดปริมาณน้ำตาลเพื่อใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยใช้สารละลายแอนโทรนที่เตรียมใหม่ในปริมาตร 2 , 3 และ 5 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณของน้ำตาลที่สามารถตรวจวัดได้มีความใกล้เคียงกัน และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วนสีของสารละลายหลังจากถูกทำปฏิกิริยาจะมีความแตกต่างกันตามปริมาตรของสารละลายแอนโทรนที่ใช้ โดยในการทดลองใช้สารละลายแอนโทรนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สีของสารหลังทำปฏิกิริยาจะมีสีเหลืองอ่อนจนเป็นสีเขียวเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 18 (ก) โดยสารจะเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของสารละลายแอนโทรนที่ใช้ ดังเช่นการใช้สารละลายแอนโทรนในปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีของสารละลายจะมีสีเหลืองจนถึงสีเขียวเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 18 (ข) และในการใช้สารละลายแอนโทรนในปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นกลูโคส 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีของสารละลายจะเป็นสีเหลืองเข้มจนถึงสีเหลืองอมเขียว ดังแสดงในภาพที่ 18 (ค) จากการทดสอบในเบื้องต้นพบว่า สีที่เปลี่ยนแปลงจากการใช้สารละลายในปริมาตรต่างๆกันเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารแอนโทรนกับน้ำตาล ซึ่งสังเกตได้ว่าการใช้สารละลายแอนโทรนในปริมาตร 2, 3 และ 5 มิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสได้หมด ค่าที่ได้จึงไม่แตกต่างกัน โดยสารแอนโทรนจะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลในความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 100 ได้ดี โดยในการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่มากกว่า 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาจจะเลือกใช้แอนโทรนในปริมาตร 3 หรือ 5 มิลลิลิตร เพื่อให้สารสามารถทำปฏิกิริยาได้หมด ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้สารละลายแอนโทรนในปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการทดลอง

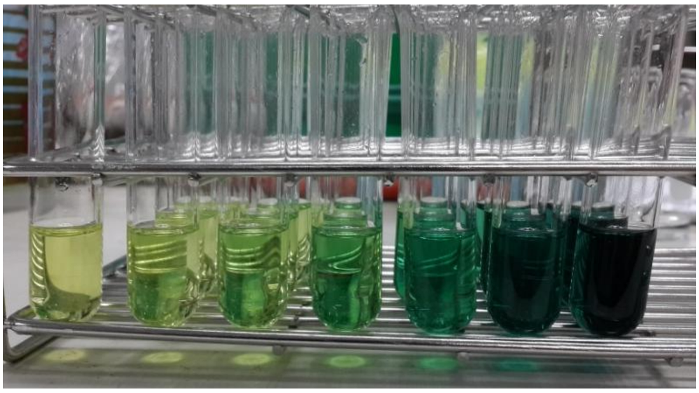
ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำกราฟมาตรฐาน

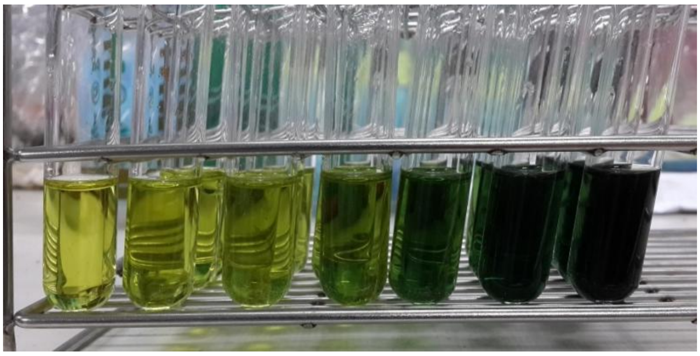
ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	แอนโทรน 2 มิลลิลิตร	แอนโทรน 3 มิลลิลิตร	แอนโทรน 5 มิลลิลิตร
5	4.49± 0.07	4.56± 0.22	4.57 ± 0.36
10	9.73± 0.15	10.26± 0.20	10.05± 0.37
25	25.44± 0.08	25.66± 0.29	25.64± 0.18
50	51.40± 0.38	50.87± 0.70	51.77 ± 0.21
100	99.06± 1.04	99.03± 0.73	98.62± 0.21

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3) สภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างทำการทดลอง

จากการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการทดลอง โดยแช่ในน้ำเย็น (ประมาณ 15 องศาเซลเซียส) ตามวิธีการของ Trelyan และคณะ (1952) เปรียบเทียบกับการทำงานที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิห้อง) เริ่มทำการทดลองโดยนำสารละลายกลูโคสใส่ในหลอดทดลองจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น แล้วเติมสารละลายแอนโทรนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นอีกครั้งในทั้งสองการทดลอง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ผลปรากฏว่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 และสามารถเปรียบเทียบค่าของน้ำตาลที่ตรวจวัดได้ดังแสดงในภาพที่ 19 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brooks และคณะ (1986) ได้กล่าวถึงระยะเวลาในการให้ความร้อนของการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกลูโคส มอลโตส และแป้งที่ระยะเวลา 2 ถึง 8 นาที พบว่า ได้ค่าใกล้เคียงกันโดยที่ระยะเวลา 5 นาที ให้ค่าการย่อยได้มากที่สุด และการเติมแอนโทรนในระยะเวลา 5 ถึง 85 นาที หลังการต้ม พบว่า ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน โดยที่ระยะเวลา 15 ถึง 35 นาที ได้ค่าดีที่สุด และวิธีนี้สามารถวัดน้ำตาลในปริมาณน้อยๆตั้งแต่ 0 ถึง 50 ไมโครกรัม ได้เป็นอย่างดี


(ก)


(ข)

(ค)

ภาพที่ 18 ลักษณะสีของสารละลายหลังจากถูกทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายแอนโทรนในปริมาตรต่างๆกัน

(ก) สีของการใช้สารละลายแอนโทรนปริมาตร 2 มิลลิลิตร

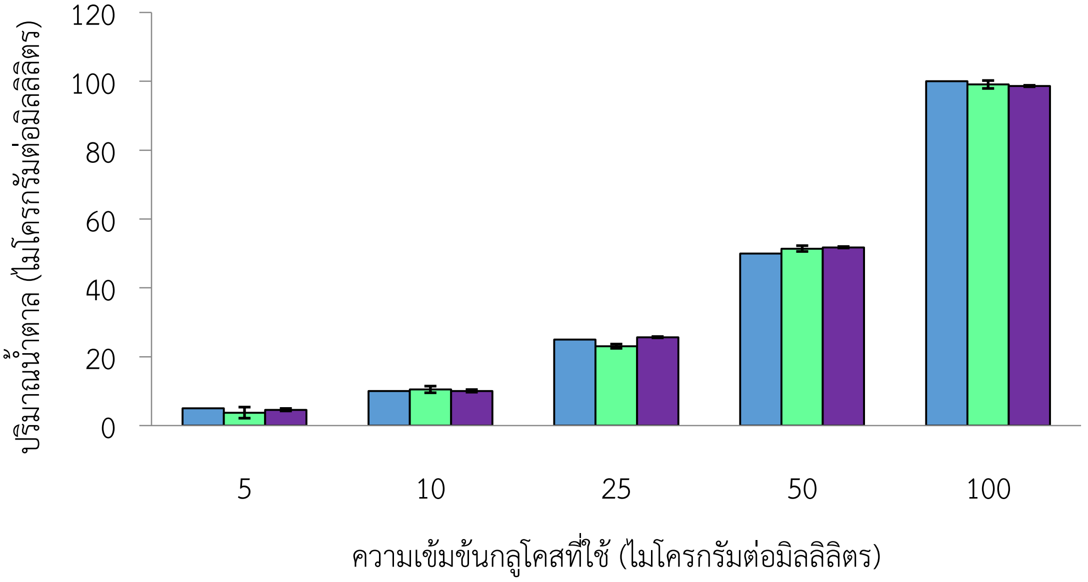
(ข) สีของการใช้สารละลายแอนโทรนปริมาตร 3 มิลลิลิตร

(ค) สีของการใช้สารละลายแอนโทรนปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	ควบคุมอุณหภูมิ	อุณหภูมิห้อง
5	5.58 ± 1.61	4.57± 0.36
10	9.69 ± 0.97	10.05± 0.37
25	23.26 ± 0.62	25.64± 0.18
50	52.33 ± 0.84	51.77 ± 0.21
100	99.61 ± 1.15	98.62± 0.21

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง และเปรียบเทียบกับการทดลองที่อุณหภูมิห้อง โดย ความเข้มข้นมาตรฐานของกลูโคส (■) ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้จากตัวอย่างโดยใช้การควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง (■) ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้จากตัวอย่างโดยไม่ควบคุมอุณหภูมิ (■)

4.1.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริก (ดัดแปลงจาก Dubois, 1959)

จากการทดสอบความสามารถในการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก จากตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* TISTR 047 ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำส่วนใสมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก พบว่า ได้ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 22.49 ± 0.31 กรัมต่อลิตร และสามารถวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากการสกัดตัวอย่างน้ำหมักโดยใช้เอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 โดยนำ

ตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำส่วนของสารละลายเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริกพบว่าได้ปริมาณน้ำตาล 0.33 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำตาลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
น้ำหมัก 48 ชั่วโมง	22.49 ± 0.31
เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สกัดโดยเอทานอลอัตราส่วน 1: 1	0.33 ± 0.01

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

จากการทดสอบจะเห็นได้ว่าวิธีนี้สามารถใช้วัดปริมาณเอ็กโซพอลิเซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดได้ แต่ให้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง โดยดูจากปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักมีปริมาณสูงกว่าน้ำตาลเริ่มต้นที่เติมลงไปในอาหารสูตร MRS ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลที่ได้ควรมีค่าลดลง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีนี้ได้รับความนิยมในการใช้วัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ดังเช่นงานวิจัยของ Smitinont และคณะ, (1999)

4.1. 3. การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีดีเอ็นเอส (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

การทดสอบความสามารถในการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีดีเอ็นเอสจากตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* TISTR 047 ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้การย่อยตัวอย่างน้ำหมักด้วยกรดซัลฟูริก จากนั้นใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางเนื่องจากการวัดด้วยดีเอ็นเอสทำงานได้ไม่ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง Scherz & Bonn, (1998) จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปทดสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอส พบว่าได้ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 14.53 ± 0. 79 กรัมต่อลิตร ในขั้นตอนการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากการสกัดตัวอย่างน้ำหมักโดยใช้เอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 โดยใช้วิธีการย่อยตัวอย่างด้วยกรดและปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยเบสคือโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 โดยใช้การวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาตรรวม 11 มิลลิลิตร พบว่าได้ค่าของน้ำตาลเท่ากับ 0.05 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีดีเอ็นเอส

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
น้ำหมัก 48 ชั่วโมง	14.53 ± 0.79
เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สกัดโดยเอทานอลอัตราส่วน 1: 1	0.05 ± 0.01

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

จากการทดสอบจะเห็นได้ว่าการใช้วิธีดีเอ็นเอสในการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัด ได้ค่าของน้ำตาลต่ำกว่าการใช้วิธีแอนโทรนและวิธีฟีนอลซัลฟูริกในการทดสอบเป็นอย่าง

มาก เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้มีน้อยเกินไป ทำให้หลังจากถูกนำมาย่อยและปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้วตัวอย่างมีอัตราการเจือจางที่มากเกินไป

วิธีดีเอ็นเอสเป็นวิธีที่ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) จึงจำเป็นต้องทำการย่อยตัวอย่างพอลิเซคคาไรด์ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งวิธีในการเตรียมตัวอย่างยังไม่เหมาะสมจึงต้องทำการดัดแปลงวิธีการและได้ผลดังนี้

1) สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยและวัดด้วยดีเอ็นเอส

การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีการย่อยตัวอย่างน้ำหมักซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* TISTR 047 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอส และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาอัตราการเจือจางที่เหมาะสม โดยใช้การทดสอบ 2 ครั้ง ซึ่งตัวอย่างมีปริมาตรเท่ากับ 250 ไมโครลิตร สามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้ 14.03 ± 1.00 และ 14.53 ± 0.79 กรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้จากตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ตัวอย่างในปริมาตรมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 8 จะเห็นได้จากในตัวอย่างที่ใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้มากมีค่า 23.76 ± 0.25 และ 26.20 ± 0.39 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างที่ใช้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร วัดปริมาณน้ำตาลได้ 27.76 ± 0.15 และ 30.25 ± 0.73กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสามารถเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่วัดค่าได้ระหว่างการทดสอบสองซ้ำ ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่วัดได้มีความสอดคล้องกันระหว่างการทดสอบทั้งสองครั้ง จากการทดสอบเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าค่าที่วัดได้น้อยมากซึ่งเป็นผลเนื่องจากการปรับปริมาตรเริ่มต้นเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการวัด และพบว่าค่าที่วัดได้เมื่อใช้ปริมาตรตัวอย่าง 500 และ 1,000 ไมโครลิตร มีค่าคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงมาก จึงทำการปรับเปลี่ยนวิธีการเจือจางใหม่

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการย่อย และปรับปริมาตรรวมเท่ากับ 50 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีดีเอ็นเอสในการวิเคราะห์

ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	
	การทดสอบครั้งที่ 1	การทดสอบครั้งที่ 2
250	14.03 ± 1.00	14.53 ± 0.79
500	23.76 ± 0.25	26.20 ± 0.39
1,000	27.76 ± 0.15	30.25 ± 0.73

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

2) การปรับอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส

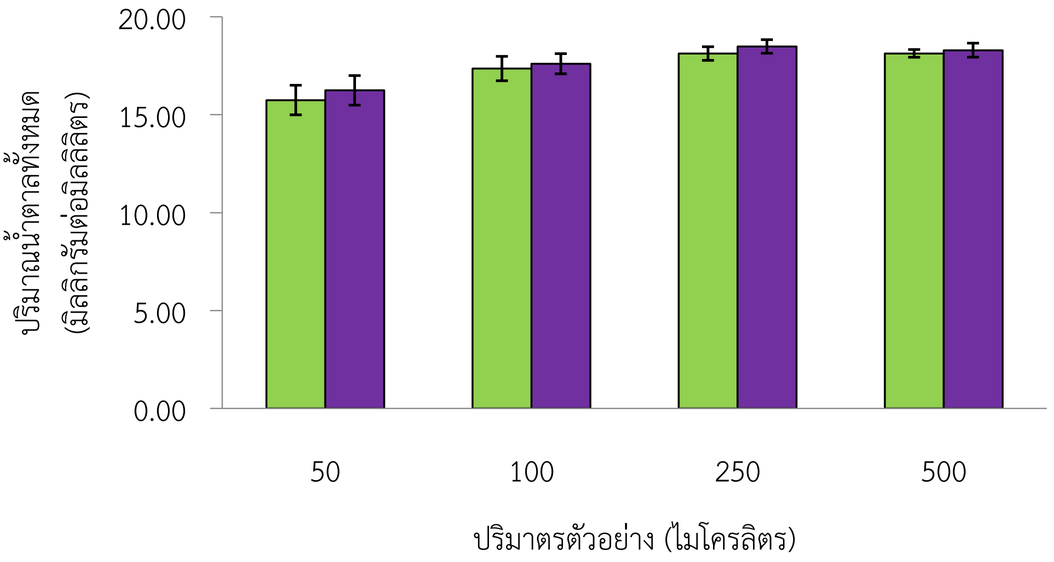
เริ่มต้นจากการย่อยตัวอย่างน้ำหมักแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่าง โดยมีตัวอย่างปริมาตรรวม 11 มิลลิลิตร มาทดสอบด้วยวิธีดีเอนเอสจากตัวอย่างเดียวกันสองครั้ง เพื่อศึกษาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่สามารถวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างพบว่า ในตัวอย่างที่หนึ่งและสองปริมาตร 100, 250 และ 500 ไมโครลิตร สามารถวัดค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 ทดลองโดยสามารถเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่วัดค่าได้ระหว่างการทดสอบทั้งสองซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 20 ส่วนในตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร พบว่าได้ค่าน้ำตาล ที่น้อยกว่าซึ่ง

อาจเกิดจากความผิดพลาดของตัวผู้ทำการทดลอง การทดสอบเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าการลดขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเป็น 50 มิลลิลิตร ก่อนการทดสอบด้วยดีเอ็นเอส สามารถวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างได้มากขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่วัดได้มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นสรุปได้ว่าการดัดแปลงวิธีการทดสอบน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีดีเอ็นเอสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้

ตารางที่ 9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักโดยลดขั้นตอนการปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีดีเอ็นเอสในการวิเคราะห์

ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิลิตร)	
	การทดสอบครั้งที่ 1	การทดสอบครั้งที่ 2
50	15.74 ± 0.76	16.24 ± 0.76
100	17.35 ± 0.62	17.35 ± 0.62
250	18.12 ± 0.35	18.48 ± 0.35
500	18.13 ± 0.20	18.29 ± 0.36

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 20 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้โดยการลดขั้นตอนการทดลองจากตัวอย่างสองชนิดโดย การทดสอบครั้งที่ 1 (■) การทดสอบครั้งที่ 2 (■)

แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังไม่เหมาะสมต่อการนำตัวอย่างตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มาทำการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอสเนื่องจากค่าของน้ำตาลที่ตรวจสอบได้ต่ำกว่าการวิเคราะห์โดยใช้วิธีแอนโทรนและวิธีฟีนอลซัลฟูริกเป็นอย่างมาก จึงได้ทำการเลือกวิธีแอนโทรน และวิธีฟีนอลซัลฟูริกในการทดสอบต่อไป

4.2 ชนิดของตัวทำละลายและอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

4.2.1 การทดสอบการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีแอนโทรน

จากการทดสอบการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดจากตัวอย่างน้ำหมักด้วยตัวทำละลายสองชนิดคือ เอทานอลและอะซิโตนในอัตราส่วนต่างๆ กัน โดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์พบว่า การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำหมัก 0.5: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.02 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในอัตราส่วน 3: 1 และ 4: 1 ได้ปริมาณน้ำตาล 0.65 ±0.01 และ 0.67 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลมีความใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนการใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายในการสกัด พบว่าที่อัตราส่วนของอะซิโตนต่อน้ำหมัก 0.5: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.10±0.01 กรัมต่อลิตร และในอัตราส่วน 4: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดอยู่ที่ 1.66 ±0.12 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 11) จากการทดสอบในเบื้องต้นพบว่าการใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหมักที่มากขึ้นจะส่งผลต่อปริมาณของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยสามารถเปรียบเทียบปริมาณของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของปริมาณน้ำตาลได้ดังแสดงในภาพที่ 21

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอล โดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์

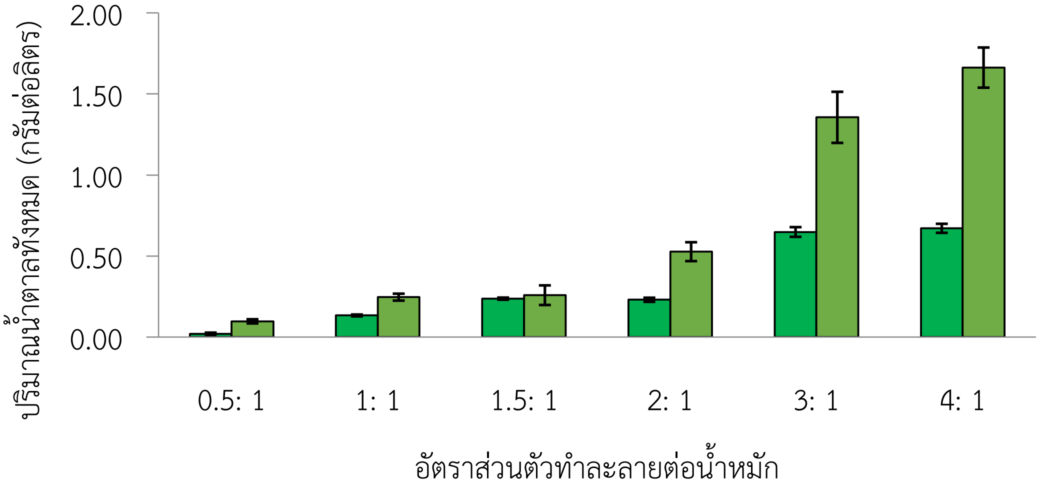
อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำหมัก	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0.5: 1	0.02±0.01
1: 1	0.13±0.01
1.5: 1	0.24±0.01
2: 1	0.23 ±0.01
3: 1	0.65 ±0.01
4: 1	0.67 ±0.03

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยอะซิโตน โดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์

อัตราส่วนอะซิโตนต่อน้ำหมัก	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0.5: 1	0.10 ±0.01
1: 1	0.25 ±0.02
1.5: 1	0.26 ±0.06
2: 1	0.53 ±0.06
3: 1	1.36 ±0.16
4: 1	1.66 ±0.12

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 21 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิด โดยใช้วิธีแอนโทรนในการวิเคราะห์ โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างที่สกัดโดยเอทานอล ( ) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างที่สกัดโดยอะซิโตน ( )

4.2.2 การทดสอบการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริก

จากการทดสอบการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดจากตัวอย่างน้ำหมักด้วยตัวทำละลายสองชนิดคือ เอทานอลและอะซิโตนในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์พบว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำหมัก 0.5: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.08 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในอัตราส่วน 4: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุดอยู่ที่ 1.23 ± 0.16 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าถ้าใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหมักมากขึ้น จะสามารถสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้มากขึ้นดังแสดงในตารางที่ 12 เช่นเดียวกับการใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายในการสกัด พบว่าที่อัตราส่วนของ อะซิโตนต่อน้ำหมัก 0.5: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลน้อยที่สุดอยู่ที่ 0.31 ±0.01 กรัมต่อลิตร และในอัตราส่วน 4: 1 ได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดอยู่ที่ 2.14 ±0.03 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่าการใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหมักที่มากขึ้นจะส่งผลต่อปริมาณของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยสามารถเปรียบเทียบปริมาณของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของปริมาณน้ำตาลได้ดังแสดงในภาพที่ 22

ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอล โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์

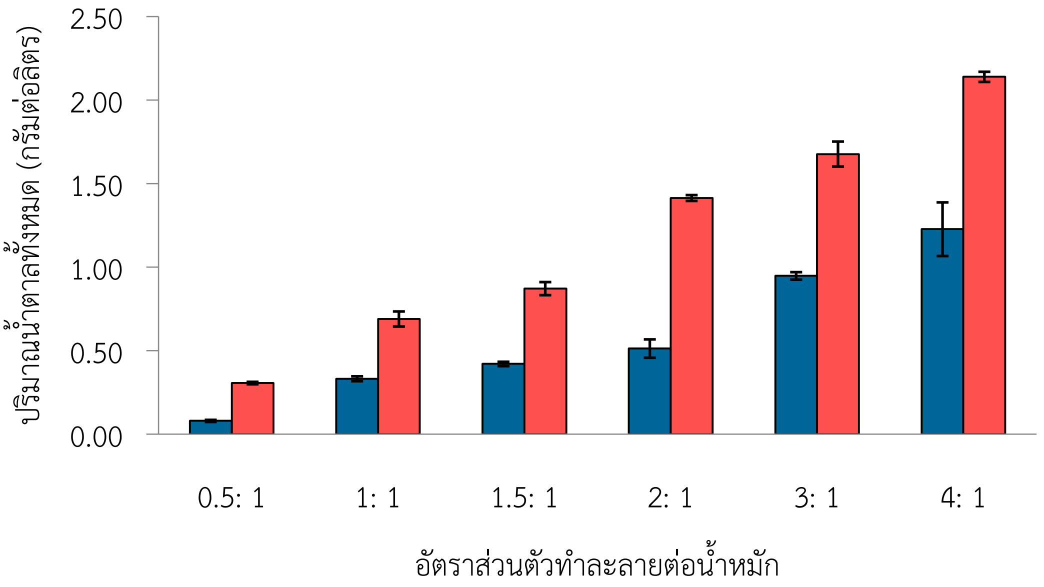
อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำหมัก	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0.5: 1	0.08 ±0.01
1: 1	0.33 ±0.01
1.5: 1	0.42 ±0.01
2: 1	0.51 ±0.05
3: 1	0.95 ±0.02
4: 1	1.23 ±0.16

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยอะซิโตน โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์

อัตราส่วนอะซิโตนต่อน้ำหมัก	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0.5: 1	0.31 ±0.01
1: 1	0.69 ±0.05
1.5: 1	0.87 ±0.04
2: 1	1.41 ±0.02
3: 1	1.68 ±0.07
4: 1	2.14 ±0.03

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 22 ปริมาณน้ำตาลจากตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิด โดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริกในการวิเคราะห์ โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างที่สกัดโดยเอทานอล ( )และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างที่สกัดโดยอะซิโตน ( )

การทดสอบการวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิดคือเอทานอลและอะซิโตน จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยวิธีแอนโทรน และฟีนอลซัลฟูริก พบว่า การใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ ได้มากกว่าเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ De Vuyst และคณะ, (1997) โดยอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อตัวอย่างเท่ากับ 4: 1 สามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้มากที่สุดจากการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี

ในการศึกษาครั้งนี้ควรเลือกวิธีแอนโทรนเป็นวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากสามารถวัดค่าปริมาณน้ำตาลได้ใกล้เคียงกับความจริง ส่วนวิธีฟีนอลซัลฟูริกให้ค่าปริมาณของน้ำตาลที่เกินความเป็นจริงอาจเป็นผลมาจากซัลเฟอร์ไปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นและทำให้ปริมาณน้ำตาลที่วัดออกมาได้มีค่าสูง

4.3 การตรวจสอบชนิดของกรดอินทรีย์ และชนิดของน้ำตาลในน้ำหมัก

ในการตรวจสอบชนิดของกรดอินทรีย์ ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. casei* TISTR 047 ในอาหารเก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนใสมาทำแห้ง โดยวิธีแช่เยือกแข็งแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างมาทำการการสกัดและย่อย เพื่อตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ที่เป็นองค์ประกอบเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ พบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบประกอบน้ำตาลกลูโคส เป็นส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 73.5 รองลงมาคือ น้ำตาลราฟิโนสร้อยละ 12.8 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เพียงเล็กน้อย จึงสรุปได้ว่าชนิดตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่เป็น hetaloexopolysaccharide ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์พบกรดซิตริกเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ตามลำดับ

บทที่ 3

สรุปผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการสร้างผลิตภัณฑ์ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

จาก การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 050, *L. plantarum* TISTR 926 และ *L. casei* TISTR 047 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง แบบไม่เขย่าเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *L. casei* TISTR 047 ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุดในสูตรอาหาร MRS คิดเป็น 4.58 $\pm$0.27 กรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระยะเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันใน อาหารสูตร MRS พบว่า *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด คิดเป็น 4.86$\pm$0.15 กรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงเลือกใช้ *L casei* TISTR 047 และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ปรับค่าความพีเอชเริ่มต้น 6.0 ในการปรับปรุงสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

ตอนที่ 2 การศึกษาน้ำตาลที่เหลือจากผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายออสโมติก ในรูปแบบสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส

จากการศึกษา น้ำตาลที่เหลือจากผลิตภัณฑ์เงาะกึ่งแห้ง ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายออสโมติกในรูปแบบสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโกฟรุกโตส เป็น แหล่งคาร์บอนทดแทนในอัตราส่วนที่แตกต่างกันในการ ดัดแปลงสูตรอาหารเหลว MRS ทั้งหมด 7 สูตรพบว่า การเลี้ยง *L. casei* TISTR 047 ในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นการเลี้ยงด้วยน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียวมีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ 49.92±0.66 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตอนที่ 3 การใช้สารอาหารราคาถูกที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์ทดแทนอาหารสังเคราะห์

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อทดแทนในสูตรอาหาร MRS ของ แบคทีเรีย *L. casei* TISTR 047 โดยมีชนิดของแหล่งคาร์บอนผสม (น้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรค์ เหลือจากการพัฒนาเงาะกึ่งแห้ง น้ำมะพร้าว น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกลูโคสไซรับ เด็กซตริน) ที่อัตราส่วนที่แตกต่างกัน และสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เด็กซตรินซ์เพียงอย่างเดียว สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด คิดเป็น 18.20 $\pm$1.67 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเด็กทรินซ์มีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนของกลูโคสไซรัปและน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ อีกทั้งแหล่งคาร์บอนที่ใช้น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการใช้งานสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่าน้ำตาลโอลิโอแซ็กคาไรด์ที่เหลือจากการพัฒนาเงาะกึ่งแห้ง และจากการศึกษาการเติมน้ำมะพร้าวเป็นตัวช่วยส่งเสริมการเจริญในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า การใช้น้ำมะพร้าวแทนการใช้น้ำปราศจากไอออนในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากกว่าการใช้น้ำปราศจากไอออน หรือการใช้น้ำปราศจากไอออนต่อน้ำมะพร้าวผสมกัน และเมื่อลดปริมาณแหล่งไนโตรเจน (เปปโตน สารสกัดจากเนื้อและสารสกัดจาก

ยีสต์) สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้มากกว่าการไม่ลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตอนที่ 4 การศึกษาวิธีการแยกบริสุทธิ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเอ็กซ์โซโพลิแซคคาร์ไรค์สูงที่สุด

จากการศึกษาผลการสกัดและการแยกบริสุทธิ์ของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ ของเชื้อ *L. casei* TISTR 047 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS (Atlas, 1946) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้ ในการวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีแอนโทรน พบว่าวิธีแอนโทรนสามารถใช้วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 15.58 ± 0.16 กรัมต่อลิตร และวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดโดยเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 มีค่าเท่ากับ 0.15 ± 0.03 กรัมต่อลิตร โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารละลายแอนโทรน เนื่องจากสารละลายแอนโทรนมีการเปลี่ยน แปลงไปตามระยะเวลาที่เก็บรักษา จึงควรเตรียมสารละลายแอนโทรนให้เพียงพอต่อการใช้งานในแต่ละครั้ง ปริมาตรของสารละลายแอนโทรนที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ พบว่าควรเลือกใช้สารละลายแอนโทรนในปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันทั้งการทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ และไม่ควบคุมอุณหภูมิ

ส่วนการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟูริก พบว่าวิธีฟีนอลซัลฟูริกสามารถใช้วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 22.49± 0.31 กรัมต่อลิตร และสามารถวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผ่านการสกัดโดยเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 มีค่าเท่ากับ 0.33± 0.01 กรัมต่อลิตร จากการทดสอบด้วยวิธีนี้พบว่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้มีค่าสูงกว่าความเป็นจริงจากเดิมที่ในอาหารมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และการวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีดีเอ็นเอส พบว่าในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยกรด ไม่จำเป็นต้องทำการปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เพราะสามารถวัดค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้จากตัวอย่างที่ปริมาตรรวม 11 มิลลิลิตร โดยค่าที่วัดได้มีความใกล้เคียงกันและวิธีนี้วัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้ 0.05 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยเกินไป

ในการศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปแบบของน้ำตาล โดยใช้อะซิโตนและเอทานอลพบว่า การใช้อะซิโตนสามารถสกัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้สูงกว่าเอทานอล โดยการใช้ตัวทำละลายในอัตราส่วนของอะซิโตนต่อน้ำหนัก 4:1 สามารถวัดค่าน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีแอนโทรนได้สูงสุดที่ 1.66 ±0.12 กรัมต่อลิตร ส่วนการใช้ตัวทำละลายอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำหนัก 4:1 ได้ค่าเท่ากับ 0.67 ±0.03 กรัมต่อลิตร ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก สามารถวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้สูงที่สุดที่ 2.14 ±0.03 และ 1.23 ±0.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและกรดอินทรีย์พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบประกอบน้ำตาลกลูโคส เป็นส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 73.5 รองลงมาคือ น้ำตาลราฟิโนสร้อยละ 12.8 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เพียงเล็กน้อย จึงสรุปได้ว่าชนิดตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่เป็น hetaloexopolysaccharide ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์ พบกรดซิตริกเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ตามลำดับ

บรรณานุกรม

Arskold E, Svensson M, Grage H, Roos S , Radstrom P & van Niel Ed WJ. 2007. Environmental influences on exopolysaccharide formation in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Int. J. Food Microbiol.,* 116: 159-167.

Aslim B, Yuksekdag ZN, Beyatli Y & Nazime M. 2005. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under differentgrowth conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol*., 21: 673-677.

Bauer R, Bekker JP, van Wyk N, du Toit C, Dicks LMT & Kossmann J. 2009. Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *Int. J. Food Microbiol*., 131: 260-264.

Cerning J, Renard CMGC, Thibault JF, Bouillanne C, London M,Desmazeaud M & Topisirovic L. 1994. Carbon source requirementsfor exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 andpartial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol*.,60(11): 3914-3919.

Cerning J, Bouillanne C, Landon M & Desmazeaud M. 1992. Isolationand characterization of exopolysaccharides from slime-formingmesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 75: 692-699.

CISZEK-LENDAM. 2011. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. *Centr Eur J Immunol* .36 (1), 51-55

Chabot, S. et al., 2001. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human andmouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mousesplenocytes. *Lait* 81, 683–69.

Dal Bello F, Walter J, Hertel C & Hammes WP. 2001. *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestiblecarbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *System. Appl. Microbiol*. 24:232-237.

De Man JC, Rogosa M & Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. Appl.* Bacteriol.23, 130-135.

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

Duenas, M., Munduate, A., Perea, A. & Irastorza, A. 2003. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus*26 in a semidefined medium under different growth conditions. *Inter. J of Food Microbiol.* 87, 113-120.

Gamar L, Blondeau K & Simonet JM (1997). Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus*strain C83. *J. Appl. Microbiol.,* 83: 281-287.

Hosono, A, Lee J, Ametani A, Natsume M, Hirayama M, Adachi T&Kaminogawa S. 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharidefraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. Biosci. *Biotechnol. Biochem.* 61, 312–316

Kimmel SA, Roberts RF & Ziegler GR. 1998.Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium. *Appl. Environ. Microbiol*., 64(2), 659-664.

Kitazawa, H, HarataT, Uemura J, Saito T, Kaneko T & Itoh T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 169–175

Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S. &Yamaguchi, T. 1991. Antitumoral activity of slimeforming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. Cremoris isolated from Scandinavian ropy sour milk, ''viili''. *Anim Sci Technol.* 62, 277–283.

Laws A , Gu Y & Marshall V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design ofbacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv*. 19, 597–625.

Lin TY & Chang Chien MF.2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem*. 100, 1419-1423.

Macedo MG, Lacroix C, Gardner NJ & Champagne CP. 2002. Effect ofmedium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate*. Int. Dairy J.,*12: 419-426.

Macedo, M.G. et al. 2002. Effect of medium supplementation onexopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595 Min whey permeate. *Int. Dairy J.* 12, 419–426

MahapatraS & Banerjee D. 2013. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. *Microbiology Insights*.6, 1–16.

Mozzi, F., Rollan, G., Savoy de Giori, G. & Font de Valdez, G. 2001. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthesis enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *J. of Appli. Microbiol*. 91, 160-167.

Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. 2005. *Leuconostoc dextransucrase* and dextran production, properties and applications. *J. of Chem. Tech. and Biotech.* 80, 845-860.

Nakajima, H. Hiromikaizu YS&Hirota T.1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J. Food Sci.* 57, 1327–1329

Rodrigues KL, Caputo LR & Carvalho JC. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *Int J Antimicrob Agents* 25, 404-408.

Seesuriyachan P, Kuntiya A, Hanmoungjai P, &Techapun C. 2011. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 33 (4), 379-387.

Senini L, Ricci G, Manachini P & Morad L (2004). EPS phenotype andgenotype in *Streptococcus thermophilus* strains of dairy origin. *Ann. Microbiol*., 54: 59-71.

Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S , Keeratipibul S, Navarini L, BoscoM & CescuttiP. 1999. Exopolysaccharide-producinglactic acid bacteria strains from traditional Thai fermentedfoods: Isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol*. 51:105–111.

Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol*.16, 41–46.

Tallon R, Bressollier P & Urdaci MC (2003). Isolation and characterizationof two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.,* 154, 705-712.

Van den Berg, D.J.C., Robijn, G.W. & Janssen, A.C. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillussake* 0–1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. And Environ. Microbiol.* 61, 2840–2844.

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T. & De Vuyst, L. 2004. Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST111 in milk-based medium. *J. of Appli. Microbiol.* 97, 1257-1273.

Velasco S, Arskold E, Paese M, Grage H, Irastorza A, Radstrom P & VanNiel EW J (2006). Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. Int. J. Food Microbiol., 111: 252-258.

Welman AD & Maddox IS. 2003. Exopolysaccharides from lactic acidbacteria: perspectives and challenges. *TRENDS in Biotechnology*. 21 (6), 269-274.

Xu R, Ma S, Wang Y, Liu L & Li P (2010). Screening, identification andstatistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *Afr. J. Microbiol. Res.,* 4(9): 783-795.

Yang X, Zhao Y, Wang Q, Wang H & Mei Q. 2005. Analysis of themonosaccharide components in Angelica polysaccharide by high performance liquid chromatography. *Anal. Sci.* 21, 1177-1180.

Yang Z, Huttunen E, Staaf M, Widmalm G & Tenhu H.1999. Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharidesproduced by slime-forming *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* strains. *Int. Dairy J.* 9, 631-638.

Yeesang C, Chanthachum S & Cheirslip B (2008). Sago starch as a lowcostcarbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. World *J. Microbiol. Biotechnol.,* 24: 1195-1201.

Yeniel N, Beyatli Y, Aslim B & Yuksekdag ZN. 2006. Designated production of exopolysaccharide (EPS) and lactic acid with sugarbeetmolasses by some lactic acid bacteria. *Zuckerindustrie.*, 131(12): 841-845.

ภาพผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. องค์ประกอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS(Man และคณะ, 1960)

Glucose	20	กรัมต่อลิตร
peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetrate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.2	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
Distilled water	1	ลิตร

2.องค์ประกอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BMM(Morishita และคณะ,1981)

Glucose	20	กรัมต่อลิตร
peptone	3	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Tryticase		
- Tryptone	9	กรัมต่อลิตร
- Soytone	2	กรัมต่อลิตร
- Sodium chloride	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetrate	1.7	กรัมต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	3	กรัมต่อลิตร
Potassium dihydrogen	3	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate hydrated	0.575	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate	0.12	กรัมต่อลิตร
Iron sulfate heptahydrate	0.034	กรัมต่อลิตร

3. องค์ประกอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ SDM(Sanchez และคณะ,2006)

Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetrate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.1	กรัมต่อลิตร

Manganese sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร
Yeast nitrogen base		
- Ammonium Sulfate	3.725	กรัมต่อลิตร
- Potassium Phosphate	0.75	กรัมต่อลิตร
- Magnesium sulphate	0.375	กรัมต่อลิตร
- Sodium chloride	0.075	กรัมต่อลิตร
- Calcium chloride	0.075	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
Distilled water	1	ลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี และการวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในรูปของน้ำตาลโดยใช้วิธีแอนโทรน (ดัดแปลงจาก Dreywood, 1946)

1.1 สารเคมี

1.1.1 กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล

1.1.2 กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 98

1.1.3 สารละลายแอนโทรน โดยชั่งแอนโทรน 0.2 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

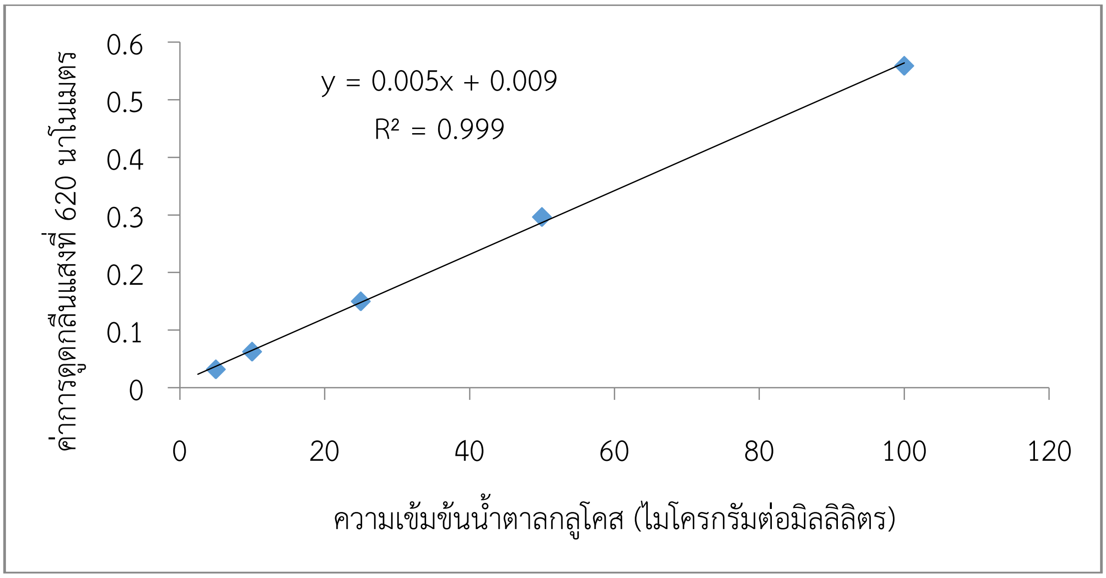
1.1.4 สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น5-100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นโดยบรรจุสารละลายลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลายแอนโทรนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เขียนกราฟ ความสำพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข 2-1

1.2.2 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยนำตัวอย่างเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการต้มมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแอนโทรนปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรและนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$



ภาพภาคผนวก ข 2-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก phenol-sulfuric method (ดัดแปลงจาก Dubois, 1959)

2.1 สารเคมี

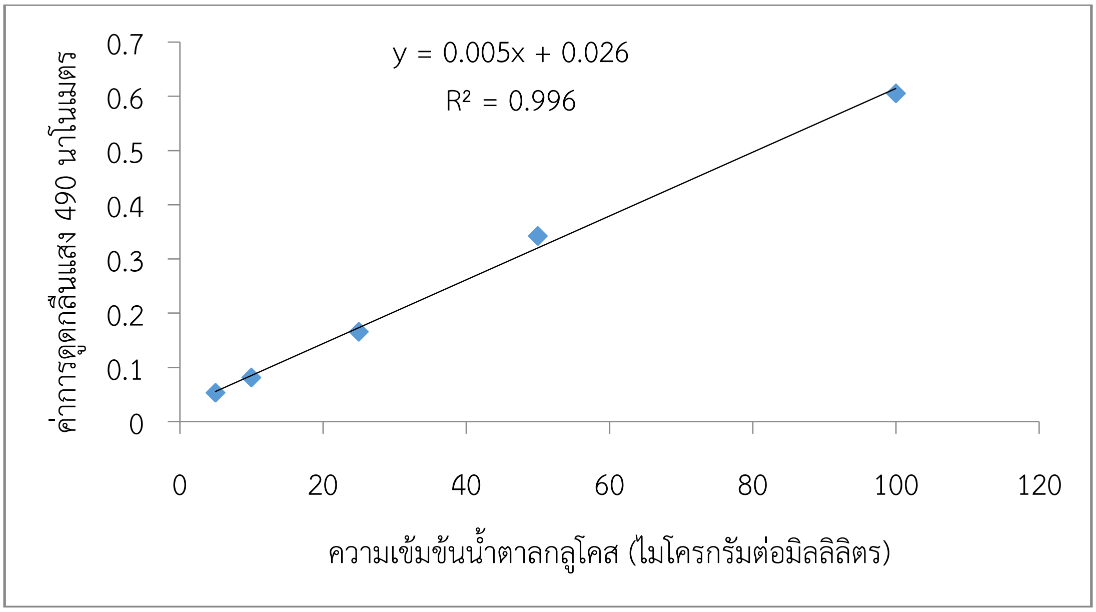
1) สารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5
2) กรดซัลฟูริกเข้มข้น
3) สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น5-100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เขียนกราฟความสำพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสงดังแสดงในภาพภาคผนวก ข 2-2

2.2.2 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$



ภาพภาคผนวก ข 2-2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

3. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส 3,5-dinitrosalicylicacid (DNS) method (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

3.1 สารเคมี

การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylid acid : DNS)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อย คนให้เข้ากันจนสารละลายใสโดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโพแทสเซียมทาร์เทต (Na-K tartrate) 300 กรัม ตามลำดับ รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนใช้งาน

3.2 วิธีการวิเคราะห์

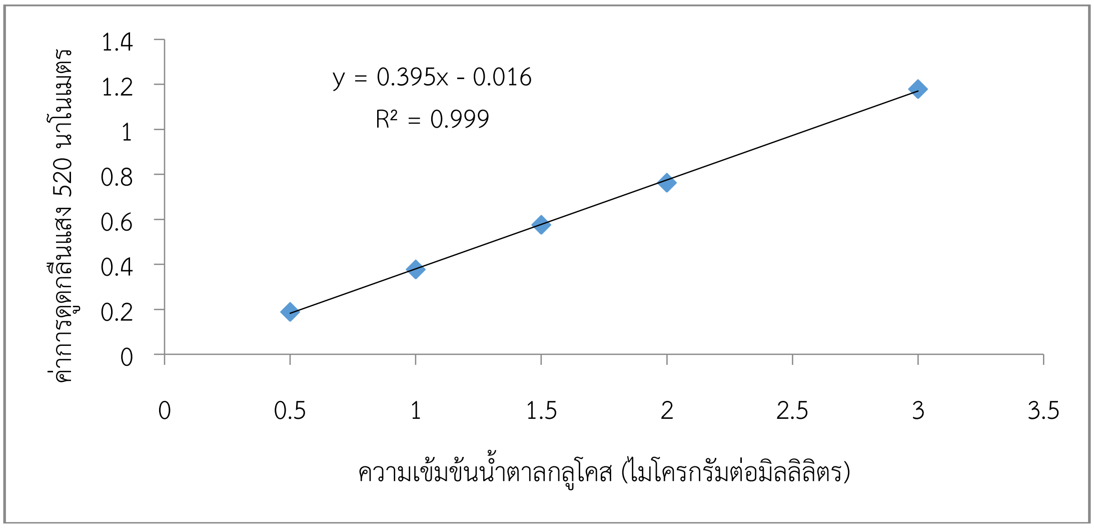
3.2.1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นดังแสดงในตารางภาคผนวก ข 2-1 จากนั้นนำสารละลายทั้ง 6 หลอดมาเติมสารละลายดีเอ็นเอส ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน น้าไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วน้าไปแช่ในน้ำเย็นเป็ น เวลา 5 นาทีเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วน้าไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรและน้าไปสร้างกราฟมาตรฐานดังแสดงในภาพภาคผนวก ข 2-3

3.2.2 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ดีเอ็นเอส ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน น้าไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วน้าไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาทีเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วน้าไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$

ตารางภาคผนวก ข 2-1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

หลอดที่	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น(ไมโครลิตร)
1	0.0	0	500
2	0.5	25	475
3	1.0	50	450
4	1.5	75	425
5	2.0	100	400
6	3.0	150	350



ภาพภาคผนวก ข 2-3 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) (ดัดแปลงจาก AOAC, 1980)

4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วสีชา

4.2 การเตรียมสารละลายฟีนอฟทาลีน

เตรียมโดยชั่งฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) (ดัดแปลงจาก AOAC, 1980)

ปิเปตน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น และหยดสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1

นอร์มอล จนสังเกตเห็นจุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ จากนั้นคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก ดังนี้

การคำนวณหาปริมาณกรดแลคติก (มก./มล.) = $\frac{A}{B} \times \frac{C}{1,000} \times 90$

A = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

B = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไป (มิลลิลิตร)