บทที่ 3

อุปกรณ์และขั้นตอนการทดลอง

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์สำคัญ

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง รุ่น ϕ 43 ของบริษัท Beckman, USA.

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

เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Safecard ของบริษัท Clay-Adams, USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuged) ของบริษัท Hitachi, Japan.

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

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

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

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

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

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

Scanning Electron Microscope ของบริษัท Shimadzu, Japan.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของบริษัท Forma Scientific, USA.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixture) ของบริษัท Scientific industries, USA.

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

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

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

เครื่องบ่มอุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C รุ่น Precision ของบริษัท Precision, USA.

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

เครื่อง High performance liquid chromatography รุ่น GC9A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

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

เครื่อง High performance size excrusion chromatography ของบริษัท Waters, USA.

1.2 <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

โปรติโอสเปปโตน (Proteose peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

เนื้อวัวสกัด (Beef extract) ของบริษัท Gibco Laboratories, USA.

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท Merck, Germany.

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

โซเดียมอะซีเตท (Sodium acetate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

ไดแอมโมเนียมซิเตรท (Diammonium citrate) ของบริษัท Merck, Germany

แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ของบริษัท Merck, Germany

น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Germany

น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

น้ำตาลแลคโตส (Lactose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

1.3 <u>สารเคมีสำหรับทดสอบทางด้านชีวเคมี</u> (Biochemical characteristics)

1.3.1 <u>สารเคมีสำหรับย้อมแกรม</u>

คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ของบริษัท Carlo, USA

เอทธานอล (Ethyl alcohol) ของบริษัท Merck, Germany

แอมโมเนียมออกซาเลท (Ammonium oxalate) ของบริษัท Merck, Germany.

ไอโอดีน (Iodine) ของบริษัท Ajax Chemical, USA,

โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ของบริษัท Carlo, USA

ซัลฟานิน (Safranin O) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

1.3.2 <u>สารเคมีสำหรับการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส</u>

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.3 <u>สารเคมีสำหรับการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต</u> (Nitrate reduction)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแทสเซียมไนเตรท (Potassium nitrate) ของบริษัท Merck, Germany.

ซัลฟานิลิกแอซิด (Sulphanilic acid) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

อะซิติกแอซิด (Acetic acid) ของบริษัท Merck, Germany.

แอลฟาแนฟทิลลามีน (α-Naphthylamine) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.4 <u>สารเคมีสำหรับทดสอบการสลายเอสคูลิน</u> (Esculin test)

เอสคูลิน (Esculin) ของบริษัท Merck, Germany.

เฟอริกซิเตรท (Ferric citrate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Germany.

เนื้อวัวสกัด (Beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท Merck, Germany.

ยีสต์เอกซ์แทรก (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

1.3.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบการสลายอาร์จินีน (Arginine test)

พาราฟิน (Parafin) ของบริษัท Whatman, USA.

โปรตีโอสเปปโตน (Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แอลอาร์จีนีนไฮโดรคลอริกแอซิด (L(+) arginine HCl) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

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

วุ้น (Agar) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.6 สารเคมีสำหรับการทดสอบการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต

1.3.6.1 Mixed indicator

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

นิวทรัล เรด (Neutral red) ของบริษัท Merck, Germany.

เอทธิล แอกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.6.2 Titrant

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.6.3 Carbohydrate

ไรโบส (Ribose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

อะราบิโนส (Arabinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ไซโลส (Xylose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แมนนิทอล (Mannitol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แลคโตส (Lactose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

มอลโตส (Maltose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แรมโนส (Rhamnose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เมลลิไซโตส (Melizitose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เด็กซ์ทริน (Dextrin) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แป้ง (Starch) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เมลลิไบโอส (Melibiose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เซลโลไบโอส(Cellobiose) ของบริษัท Sigma Chemical Company,USA.

ซอร์บิทอล (Sorbitol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แมนโนส (Mannose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ฟรุกโตส (Fructose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

อะราบิโนส (Arabinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ราฟฟิโนส (Raffinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

1.3.7 <u>เคมีภัณฑ์สำหรับตกตะกอนเอกโซพอลิแซคคาไรด์</u>

เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) (95%) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.8 <u>เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านเคมี</u>

1.3.8.1 <u>Total sugar</u>

ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท Merck, Germany.

ซัลฟูริกแอซิด (Sulphuric acid) ของบริษัท Carlo, USA

1.3.8.2 <u>Total nitrogen</u>

โคแมสซี่บิลเลียนท์ บลู (Coomassie blue) Merck, Germany.

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

1.3.8.3 <u>การวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว</u>

อะซีโตไนไตร (Acetonitrile) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.8.4 <u>การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซคคาไรด์</u>

เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

1.3.8.5 <u>การทดสอบคุณสมบัติด้านความหนืด</u>

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

ไฮโดรคลอริกแอซิด (Hydrochloric acid) ของบริษัท Merck, Germany.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ของบริษัท Merck, Germany.

แซนแทนกัม (Xanthan gum) (Sanofi, Commercial grade)

<u>ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย</u>

1. <u>การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิต EPS ได้บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว</u>

นำเชื้อแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักดอง เช่น แหนม ไส้กรอก เปรี้ยว ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หน่อไม้ดอง ปลาส้ม หอมดอง ใบเมี่ยงหมัก ฯลฯ และน้ำอ้อยจากโรงงานน้ำตาล จำนวน 130 เชื้อ มาตรวจสอบความสามารถในการผลิต EPS โดยใช้วิธี steak เชื้อบนอาหารวุ้น MRS (De Man *et al.*, 1960) และในอาหารเหลว MRS ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเติบโตได้ดี โดยมีส่วนประกอบดังนี้

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

Sugar	30.0	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5.0	กรัมต่อลิตร
Diammonium citrate	2.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1.0	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4.H_2O$	0.05	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	2.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร (เฉพาะในอาหารแข็ง)

ในการศึกษาจะทำการแปรชนิดของน้ำตาล คือ กลูโคส แลคโตส ซูโครส และฟรุกโตส สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิต EPS ได้หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะให้สารที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มบนอาหารแข็ง สำหรับในอาหารเหลวจะพบว่าหลังจากที่นำอาหารที่เลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที โดยส่วนของอาหารเหลวจะมีลักษณะขุ่นขาว แยกตะกอนของเซลล์ออกแล้วนำส่วนของ supernatant ไปทำการตกตะกอน EPS โดยใช้ 95 % เอทธานอล แล้วทำการวัด EPS ตามวิธีของ Kinery และคณะ (1969)

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ลักษณะการเจริญ และลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยยึดแนวจัดจำแนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Kandler and Wiess, 1986)

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, การเจริญ และสรีรวิทยาของเชื้อ
(Morphological and Cultural Characteristics)

2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการตรวจสอบและบันทึกลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS วัดขนาดของเซลล์ด้วยไมโครมิเตอร์ (Cell size) ตรวจสอบการติดสีแกรม

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

2.1.2 <u>การทดสอบการเจริญที่ pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ</u>

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่แปร pH 4 ระดับ คือ 4, 4.5, 8.0, 8.5 อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 45 และ 50 องศาเซลเซียส และการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน 4 ระดับ คือ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปมไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ ตรวจผลการสร้างกรดโดยหยด Mixed indicator (ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 5) ลงไป ถ้ามีสีเกิดขึ้นแสดงว่ามีการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วนำมาไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH เพื่อดูปริมาณการสร้างกรด

2.2 <u>สมบัติทางชีวเคมี</u>

2.2.1 <u>การทดสอบเอนไซม์</u> Catalase test

ทดสอบโดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลงบนโคโลนีของเชื้อที่มีอายุ 3 วัน ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่า แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ catalase

2.2.2 <u>การรีดิวซ์ไนเตรต</u> (Nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวไนเตรต (ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 2) แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน สอบโดยหยดกรดซัลฟานิลิค และแอลฟา:แนฟธิลอามีน ถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ ถ้าไม่ให้ผลดังกล่าว ทดสอบยืนยันโดยใส่ผงสังกะสี ผลการทดสอบจึงเป็นลบแท้จริงแต่ถ้าไม่เกิดสีแดง ผลการทดสอบรีดิวซ์ไนเตรตนั้นเป็นจริง

2.2.3 <u>การสลายเอสคูลิน</u> (Hydrolysis of esculin)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว esculin (ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 3) แล้วบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาล

และการเกิดผลึกคล้ายปะการังขึ้น เนื่องจากการสลาย esculin เป็น esculetin แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

2.2.4 <u>การสลายอาร์จีนีน</u> (Hydrolysis of arginine)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว arginine (ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 4) แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ผลการทดสอบเป็นบวก

2.2.5 <u>การทดสอบการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำตาลไรโบส อะลาบิโนส ไซโลส แมนนิทอล แลคโตส มอลโตส เมลลิไซโทส ซู โครส แรมโนส เมลลิไบโอส เซลโลไบโอส ซอร์บิทอล ซาลิซิน ซอร์โบส แมนโนส ฟรุคโตส ทีฮาโลส ราฟฟิโนส เป็นต้น หลังจากเพาะเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ตรวจผลการสร้างกรดโดยหยด Mixed indicator ลงไปถ้ามีสีเกิดขึ้นแสดงว่ามีการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วนำมาไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH เพื่อดูปริมาณการสร้างกรด (Holzapfel and Schillinger , 1992: Weiss, 1992)

3. <u>การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิต EPS</u>

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาศึกษาลักษณะการเจริญและและการผลิต EPS ในอาหารเหลว MRS (De Man *et al.*, 1960) ที่มีชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS ที่ได้จากข้อ 2 ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เชื้อตั้งต้น (starter) ที่มีอายุ 12-16 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อตั้งต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ใน 24 ชั่วโมงแรก

<u>ประเมินผลการทดลอง</u>

- วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter
- วัดปริมาณเซลล์ (Van den Berg *et al.*, 1995) (ตามภาคผนวก ข ข้อที่ 1)
- วัดปริมาณ EPS (Keniry *et al.*, 1969) (ตามภาคผนวก ข ข้อที่ 2)

4. <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS</u>

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 ที่มีอัตราการสร้าง EPS สูงมาเลี้ยงในอาหาร MRS (De Man *et al.*, 1960) โดยใช้เชื้อตั้งต้น (starter) ที่มีอายุ 12-16 ชั่วโมง 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 เวลาในการบ่ม 72 ชั่วโมง โดยแปร

4.1 <u>องค์ประกอบของอาหาร</u>

4.1.1 <u>ปริมาณน้ำตาล</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS โดยใช้น้ำตาลที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS จากข้อ 2 โดยแปรปริมาณน้ำตาลเป็น 11 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3

4.1.2 <u>ปริมาณไนโตรเจน</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 แล้วแปรแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วย Proteose peptone, Beef extract และ Yeast extract โดยแปร Yeast extract เป็น 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร Proteose peptone และ Beef extract เป็น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร วางแผนการทดลองเป็นแบบ Symmetric Factorial design ขนาด 4x4x4 การทดลอง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3

4.1.3 <u>ปริมาณแร่ธาตุ</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลและปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมจาก ข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 ตามลำดับ โดยแปรปริมาณแร่ธาตุในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประกอบด้วย $MgSO_4 .7H_2O$ และ $MnSO_4 .H_2O$ โดยแปร $MgSO_4 .7H_2O$ เป็น 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.2 และ 0.4 กรัมต่อลิตร ส่วน $MnSO_4 .H_2O$ แปรเป็น 4 ระดับ คือ 0, 0.025, 0.05 และ

0.1 กรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองเป็นแบบ Symmetric Factorial design ขนาด 4x4 การทดลองทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง EPS

4.2.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่า

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาณโปรตีน และแร่ธาตุเหมาะสมจากข้อ 4.1.1, 4.1.2 และ 4.1.3 ตามลำดับ เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารต่างกันโดยแปรปริมาตรอาหารเป็น 6 ระดับ คือ 25 , 50 , 75 , 100 , 125 และ 150 มิลลิลิตร และทดลองเปรียบเทียบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีกับการไม่เขย่า วางแผนการทดลองเป็นแบบ Asymmetric Factorial design ขนาด 4x2 การทดลองทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3

4.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาณโปรตีน แร่ธาตุ อัตราส่วนของอากาศต่ออาหารและการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS จากข้อ 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 และ 4.2.1 ตามลำดับ โดยแปรอุณหภูมิเป็น 4 ระดับคือ 20, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ประเมินผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3

5. การทำให้ EPS บริสุทธิ์บางส่วน (EPS Partial purification)

เมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS ได้แล้ว นำเชื้อนั้นมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml. เพื่อให้ได้ปริมาณมากขึ้น โดยนำเชื้อมาเลี้ยงตามสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 2 วัน นำไปปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่อง Refrigerated centrifuge ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (Abbad *et al.*, 1995) ทำการปั่นแยกเซล 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายส่วนใสไป

ตกตะกอนโดยใช้เอทธานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกอีกด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วละลาย EPS ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึง นำไปทำการ dialysis ในน้ำกลั่นเป็น เวลา 3 วัน (เปลี่ยนน้ำวันละ 2 ครั้ง) แล้วจึงนำสารละลาย EPS ที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer

6. <u>การศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืดของ EPS ในน้ำกลั่นความเข้มข้นต่าง ๆ กัน</u>

นำ EPS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากข้อ 5 มาละลายในน้ำกลั่นโดยแปรความเข้มข้นของ EPS เป็น 7 ระดับ ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง (ตามภาคผนวก ข ข้อที่ 3) โดยพิจารณาความเข้มข้นของ EPS ที่ให้ความหนืดใกล้เคียงกับ xanthan gum ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

7. <u>ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติด้านความหนืด</u>

7.1 <u>ผลของอุณหภูมิ</u>

นำ EPS มาละลายในน้ำกลั่นโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 6 แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30 , 50 , 70 , 100 เป็นเวลา 20 นาที และ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายทั้งหมดไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง

7.2 <u>ผลของ pH</u>

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

7.3 <u>ผลของเกลือต่อความหนืด</u>

นำ EPS มาละลายในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 6 แล้วเติมเกลือที่แปรเป็น 2 ชนิด คือ NaCl และ KCl และแปรปริมาณความเข้มข้นของเกลือเป็น 7 ระดับ คือ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10% ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Haake Rotoviscometer RV20 โดยใช้หัววัดชนิด NV 100 ในช่วงความเร็วรอบ 0-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึก 10 ครั้ง

8. <u>การศึกษาคุณสมบัติของ EPS</u>

นำ EPS ที่ผ่านผลิตและทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 5 มาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดังนี้

8.1 <u>ชนิดประจุของโพลีแซคคาไรด์</u> (Ueda *et al.*,1981)
(ตามภาคผนวก ค ข้อที่ 1)

8.2 <u>การทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของ EPS</u>
(Leon-Barrios *et al.*, 1992) (ตามภาคผนวก ค ข้อ 2)

8.3 <u>การทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่อง HPSEC</u>
(ตามภาคผนวก ค ข้อ 3)

8.4 <u>การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด</u> โดยใช้วิธี Phenol sulfuric
(Dubios *et al.*, 1956) (ตามภาคผนวก ค ข้อ 4)

8.5 <u>การทดสอบหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด</u> โดยใช้วิธี Protein Dye Binding
(Bradford, 1976) (ตามภาคผนวก ค ข้อ 5)