ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Proteose peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Polysorbate 80	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.10	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 55.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Agar (NA)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 8.0 กรัม (NB) และ 23.0 กรัม (NA) ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Minimal medium

องค์ประกอบ minimal medium

peptone water	2.0	กรัมต่อลิตร
yeast extract	2.0	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.1	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.04	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.04	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.6H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_20$	0.01	กรัมต่อลิตร
$NaHCO_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
Tween 80	2	มิลลิลิตรต่อลิตร
cysteine–HC1	0.5	กรัมต่อลิตร
Bile salt	0.5	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารแต่ละส่วนประกอบต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Mueller Hington Broth

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef infusion	300	กรัมต่อลิตร
Casein acid hydrolysate	17.50	กรัมต่อลิตร
Starch	1.50	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 21.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Muller Hington Agar

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef infusion	300	กรัมต่อลิตร
Casein acid hydrolysate	17.50	กรัมต่อลิตร
Starch	1.50	กรัมต่อลิตร
Agar	17.00	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 38.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Modified dinitrosalicylic acid

องค์ประกอบ

NaOH	10	กรัมต่อลิตร
Na_2SO_3	0.5	กรัมต่อลิตร
Sodium potassium tratrat	200	กรัมต่อลิตร
3,5-Dinitrosalicylic acid	10	กรัมต่อลิตร
Phenol	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง NaOH ตามปริมาณที่กำหนด ละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นนำส่วนประกอบที่เหลือละลายในสารละลาย NaOH ที่เตรียมไว้ คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้น นำมาปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Modified phenol sulfuric acid

Phenol	50	กรัมต่อลิตร
Con. Sulfuric		

วิธีการเตรียม

ชั่ง Phenol ตามปริมาณที่กำหนดละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.8 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม HCl buffer

องค์ประกอบ

NaCl	8.00	กรัมต่อลิตร
KCl	0.20	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4 $2H_2O$	8.25	กรัมต่อลิตร
NaH_2PO_4	14.35	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 2H_2O$	0.10	กรัมต่อลิตร
$MgCl_2$ $6H_2O$	0.18	กรัมต่อลิตร
HCl 5 M		

วิธีการเตรียม

ชั่งแต่ละส่วนประกอบละลายในน้ำกลั่น 0.8 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.9 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์

การเตรียมเอนไซม์

เอนไซม์ human pancreatic α-amylase (EC 3.2.1.1) (Sigma) ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใน (20 mM) ใน โซเดียมคลอไรด์ (6.7 mM) ซึ่งปรับพีเอชให้ได้ 6.9 โดยใช้ 1 N NaOH

1.10 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

องค์ประกอบ

NaCl	9	กรัมต่อลิตร
$Na_2HPO_4.2H_2O$	9	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5	กรัมต่อลิตร
5 M HCl		

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีแต่ละส่วนประกอบต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับพีเอชเป็น 1, 2, 2.5 และ 3 ด้วย 5 M HCl

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

ตารางที่ 10 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะความเป็นกรด

Table 10. Survival of lactic acid bacteria in acidic condition.

Isolates	pH/hour	Log CFU/ml				
		0	1	2	3	4
APa 4	2	9.01	4.72±0.23	2.60±0.12	-	-
	2.5	9.56	5.65±0.10	3.80±0.18	-	-
	3	9.02	7.16±0.10	4.61±0.14	3.81±0.19	2.54±0.10
AIa 1	2	9.03	3.71±0.11	-	-	-
	2.5	8.77	5.83±0.22	3.49±0.09	-	-
	3	9.03	8.18±0.15	6.28±0.23	4.72±0.10	3.73±0.08
APa 5	2	9.34	-	-	-	-
	2.5	10.48	3.63±0.26	2.87±0.26	-	-
	3	9.44	6.40±0.03	4.30±0.30	-	-
AEa 3	2	8.86	-	-	-	-
	2.5	8.69	3.48±0.08	-	-	-
	3	8.75	7.33±0.13	3.48±0.22	-	-
ARa 1	2	9.78	3.59±0.16	-	-	-
	2.5	9.48	4.91±0.15	3.83±0.25	-	-
	3	9.78	8.45±0.07	6.30±0.30	5.48±0.31	3.87±0.18
AEa2	2	8.7	-	-	-	-
	2.5	8.65	3.65±0.21	-	-	-
	3	8.7	7.48±0.26	6.48±0.40	5.48±0.30	4.48±0.11

1. ลำดับเบสของไอโซเลต ARa1 ซึ่งมีความเหมือนกับ *Enterococcus faecium* (GenBank accession number AY 675247) เท่ากับ 98 (492/501 bp) เปอร์เซ็นต์

GTTATTGATTATGACGTCTTGTCTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGA
TGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCT
ATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCA
AGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTC
TGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTT
AAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCT
TCGGCTCANCNGAAAAGTGCATTGGAAACTGGGANACTTGAGTGCAAAAANGACAG
TGGAACTCCNTGTGTANCGGTGAAATGCNTAAATATATGGAAAACCCCATTGNNAAG
GCGNTTTTCTGGTCTGCACTGACCTNAGCTCCAAACNTGGGTACCAACNGATNNAAN
ACCNNGGNAAA

2. ลำดับเบสของไอโซเลต APa4 ซึ่งมีความเหมือนกับ *Pediococcus pentosaceus* SL4 (GenBank accession number AY 675245) เท่ากับ 98 (655/668 bp) เปอร์เซ็นต์

GATTATGACGTACTTGTCTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTG
AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCT
AATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATC
ACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGCAAAGGCTCACCAAGG
CAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAA
GAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCA

CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTANGTCTATGTGAAAGCCTTCGGC
TCANCCGAAAAAGTGCATTGGAAACTGGGANACTNGAGTGCANAAAAGGACAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATNTTGGNAAAACCCCANTGGCNAAGGC
GNCTGTCTGGTCTGCACCTGACNCTGAGCTCNAANCCTGGGTANCNACAGATTTNNT
TCCCCTGGTAAANN

3. ลำดับเบสของไอโซเลต AIa1 ซึ่งมีความเหมือนกับ *Pediococcus pentosaceus* LM2 (GenBank accession number AY 675243) เท่ากับ 97 (691/712 bp) เปอร์เซ็นต์
GGCGGCGTGCCTAATCATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCAC
CGGAAAAAGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGA
AGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGT
TTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACKATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCASCAGTAGGG
AATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
TTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGASAGTAACTGTTCCTC
CCTTGACGGYATCTAACCAAAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCACCACCSGGGNNN

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอช 1, 2 และ 3

Table 11. Hydrolysis of the extracts prepared from plant extracts in HCl solution with pH of 1 , 2 and 3

		% hydrolysis			
Plants extracts	pH/Time	1	2	3	4
jewel-sweet potato	1	12.03±0.53	12.67±0.78	21.89±1.29	26.82±0.02
	2	0.96±0.45	4.64±0.49	5.76±0.15	6.36±1.87
	3	0.86±0.05	0.79±0.13	1.18±0.13	5.13±0.30
yam bean	1	8.22±0.29	21.45±1.49	26.86±1.39	35.86±1.26

	2	1.69±0.08	3.22±0.34	8.30±0.37	13.22±0.13
	3	3.76±0.06	4.54±0.40	6.03±0.76	4.88±0.04
labanos	1	20.50±0.15	31.33±0.68	24.29±0.36	39.56±0. 11
	2	21.03±0.92	23.10±0.46	21.65±0.84	20.94±0.28
	3	18.61±0.69	13.59±0.39	12.66±0.10	17.29±0.10
madagascar potato	1	14.54±0.36	28.02±0.20	26.27±0.28	31.79±0.69
	2	2.33±0.31	20.53±0.42	22.62±0.14	23.25±0.25
	3	0.23±0.05	7.43±0.26	5.58±0.65	9.71±0.24
white-sweet potato	1	15.80±0.27	31.26±0.40	42.76±2.65	54.51±1.02
	2	4.03±1.05	8.58±0.56	8.94±1.49	11.52±0.80
	3	2.57±0.17	3.25±0.49	3.18±0.15	4.72±0.88
carrot	1	9.61±0.58	12.56±1.04	21.07±1.37	28.13±0.81
	2	2.74±0.06	13.75±0.46	13.82±1.35	12.84±0.45
	3	2.46±0.50	17.84±0.60	14.87±0.07	14.24±0.50
cyperus	1	45.52±1.17	59.38±0.18	55.49±0.86	64.50±0.77
	2	26.56±1.49	41.24±0.66	42.81±0.30	52.62±1.31
	3	19.79±0.27	44.37±0.68	49.57±0.13	45.86±0.09
taro	1	7.95±0.31	10.11±0.61	11.77±0.22	17.47±0.53
	2	4.71±0.51	7.71±0.64	7.85±0.43	11.88±0.52
	3	4.39±0.26	6.48±0.26	7.59±0.19	10.77±0.31

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Cont.)

		% hydrolysis			
Plants extracts	pH/Time	1	2	3	4
red sweet potato	1	2.91±0.29	4.76±0.37	8.67±0.55	9.29±0.60
	2	1.07±0.40	2.08±0.58	2.80±0.36	3.15±0.46
	3	0.27±0.19	0.29±0.04	0.42±0.03	0.63±0.22
beetroot	1	1.66±0.156	2.40±0.03	3.39±0.29	5.04±0.11
	2	0.87±0.12	0.99±0.24	1.53±0.30	1.73±0.36

	3	0.83±0.08	0.85±0.11	0.91±0.19	1.12±0.15
potato	1	0.56±0.07	0.86±0.12	0.92±0.22	1.70±0.36
	2	0.28±0.11	0.47±0.19	0.47±0.42	0.90±0.20
	3	0.09±0.07	0.19±0.08	0.30±0.06	0.37±0.04
purple sweet potato	1	0.61±0.04	1.44±0.35	2.79±0.26	2.82±0.23
	2	0.37±0.22	0.85±0.25	1.13±0.09	1.12±0.11
	3	0.28±0.16	0.75±0.27	0.98±0. 2	1.10±0.05

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase ของสารสกัด

Table 12. Enzymatic hydrolysis of extracts by α-amylase.

Plants extracts	% hydrolysis
taro	10.81±0.41
red sweet potato	1.50±0.11
beetroot	4.94±0.29
potato	2.13±0.12
purple sweet potato	1.17±0.17

ตารางที่13 การเจริญของโปรไบโอติกในอาหาร minimal medium ที่ใช้ สารสกัดชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

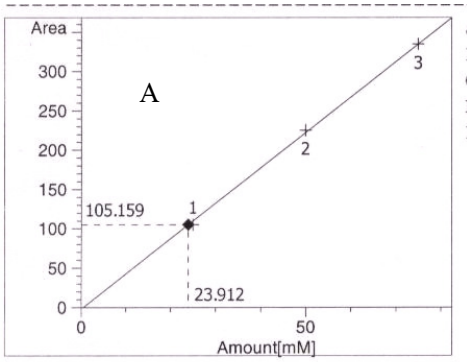
Table 13. Growth of probiotic used extracts as carbon sources in minimal medium.

Bacteria	Time (h)	Log CFU/ml				
		Red-sweet potato	Beetroot	Potato	Purple-sweet potato	glucose
L. platarum	0	7.155±0.22	7.15±0.22	7.20±0.24	7.17±0.24	7.24±0.20
	6	7.93±0.30	8.35±0.44	8.73±0.35	7.97±0.08	7.90±0.06
	12	9.13±0.24	9.38±.40	9.45±0.49	9.49±0.02	9.686±0.23
	24	10.03±0.32	11.36±0.25	10.22±0.35	10.72±0.32	10.87±0.11
	36	9.48±0.31	10.98±0.44	9.19±0.16	9.79±0.22	9.70±0.14
	48	8.38±0.38	9.61±0.43	8.28±0.12	8.67±0.14	8.10±0.15
	72	7.84±0.11	8.29±0.25	7.99±0.06	7.58±0.49	7.72±0.24
L. acidophilus	0	6.74±0.26	7.37±0.17	7.70±0.21	7.38±0.17	7.50±0.37
	6	6.65±0.49	7.93±0.07	8.29±0.35	8.03±0.21	8.60±0.57
	12	8.44±0.33	8.63±0.34	9.35±0.23	8.76±0.217	9.21±0.54
	24	8.74±0.29	8.77±0.08	10.44±0.49	8.97±0.28	11.47±0.48
	36	8.82±0.059	8.68±0.26	10.27±0.71	8.55±0.36	11.69±0.36
	48	8.53±0.14	8.16±0.07	9.59±0.35	8.16±0.07	11.32±0.37
	72	8.11±0.02	7.82±0.06	8.15±0.42	7.82±0.06	10.25±0.56
Ent. faecium	0	7.55±0.14	7.45±0.21	7.39±0.25	7.54±0.14	7.56±0.21
	6	7.79±0.57	7.95±0.25	8.09±0.04	9.23±0.66	8.79±0.41
	12	8.95±0.67	8.70±0.43	8.56±0.29	9.88±0.52	9.95±0.32
	24	10.08±0.88	10.22±0.41	9.72±0.25	10.15±0.13	10.73±0.45
	36	8.84±0.14	9.25±0.66	8.97±0.86	9.41±0.39	9.84±0.41
	48	8.02±0.42	8.03±0.32	7.58±0.28	9.36±0.40	9.02±0.30
	72	7.41±0.32	7.57±1.20	6.90±0.38	8.82±0.22	8.42±0.24

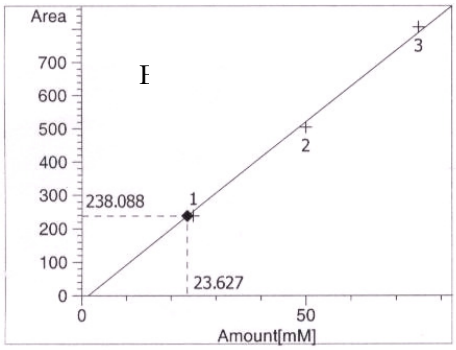
ตารางที่14 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียก่อโรค และ *L.plantarum* โดยใช้ สารสกัดเป็นแหล่งคาร์บอน

Table 14. Co-culture of pathogen and *L.plantarum* used ethanolic as carbon sources.

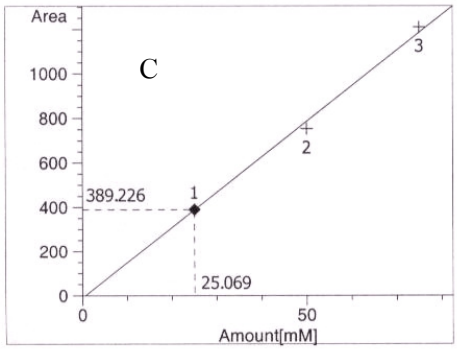
Bacteria	Time (h)	LogCFU/ml				
		Red-sweet potato	Beetroot	Potato	Purple-sweet potato	glucose
Salmonella sp.	0	6.28±0.26	6.20±0.26	6.38±0.26	6.35±0.36	6.24±0.40
	12	8.41±0.09	8.70±0.07	8.37±0.18	8.44±0.16	8.56±0.13
	24	5.46±0.09	4.67±0.39	3.50±0.19	5.06±0.24	5.66±0.41
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
E. coli	0	6.32±0.26	6.00±0.55	6.38±0.55	6.47±0.47	6.06±0.27
	12	8.37±0.14	9.14±0.11	8.80±0.13	8.61±0.44	9.15±0.22
	24	4.75±0.29	5.27±0.29	5.37±0.46	4.27±0.72	7.66±0.25
	48	0	0	1.80±0.14	0	5.78±0.08
	72	0	0	0	0	4.02±0.45
S. aureus	0	6.48±0.14	6.40±0.21	6.29±0.25	6.45±0.14	6.54±0.21
	12	7.19±0.39	7.23±0. 34	7.82±0.09	7.85±0.14	7.14±0.22
	24	1.50±0.28	0	4.45±0.21	0	5.80±0.14
	48	0	0	3.16±0.17	0	4.33±0.18
	72	0	0	1.50±0.28	0	3.70±0.34



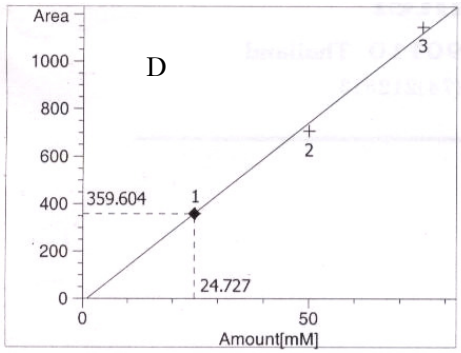
acetic at exp. RT: 5.550
FID1 A,
Correlation: 0.99970
Residual Std. Dev.: 4.33423
Formula: y = mx + b
m: 4.49407
b: -2.30192
x: Amount[mM]
y: Area



propionic at exp. RT: 6.205
FID1 A,
Correlation: 0.99862
Residual Std. Dev.: 22.27899
Formula: y = mx + b
m: 10.72891
b: -15.40157
x: Amount[mM]
y: Area



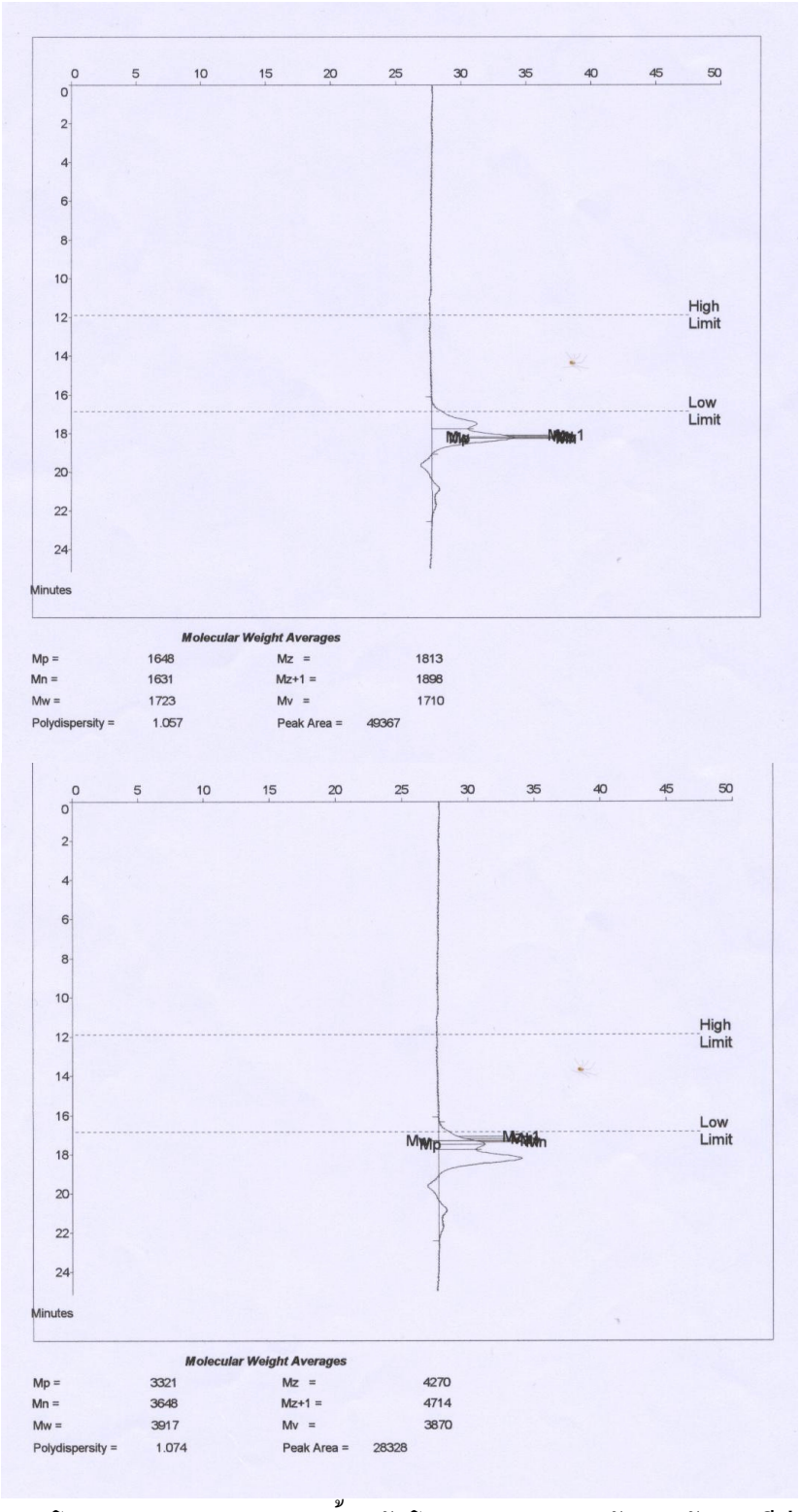
i-butyric at exp. RT: 6.420
FID1 A,
Correlation: 0.99885
Residual Std. Dev.: 30.27349
Formula: y = mx + b
m: 15.95691
b: -10.80414
x: Amount[mM]
y: Area



butyric at exp. RT: 6.892
FID1 A,
Correlation: 0.99845
Residual Std. Dev.: 33.34616
Formula: y = mx + b
m: 15.14526
b: -14.89562
x: Amount[mM]
y: Area

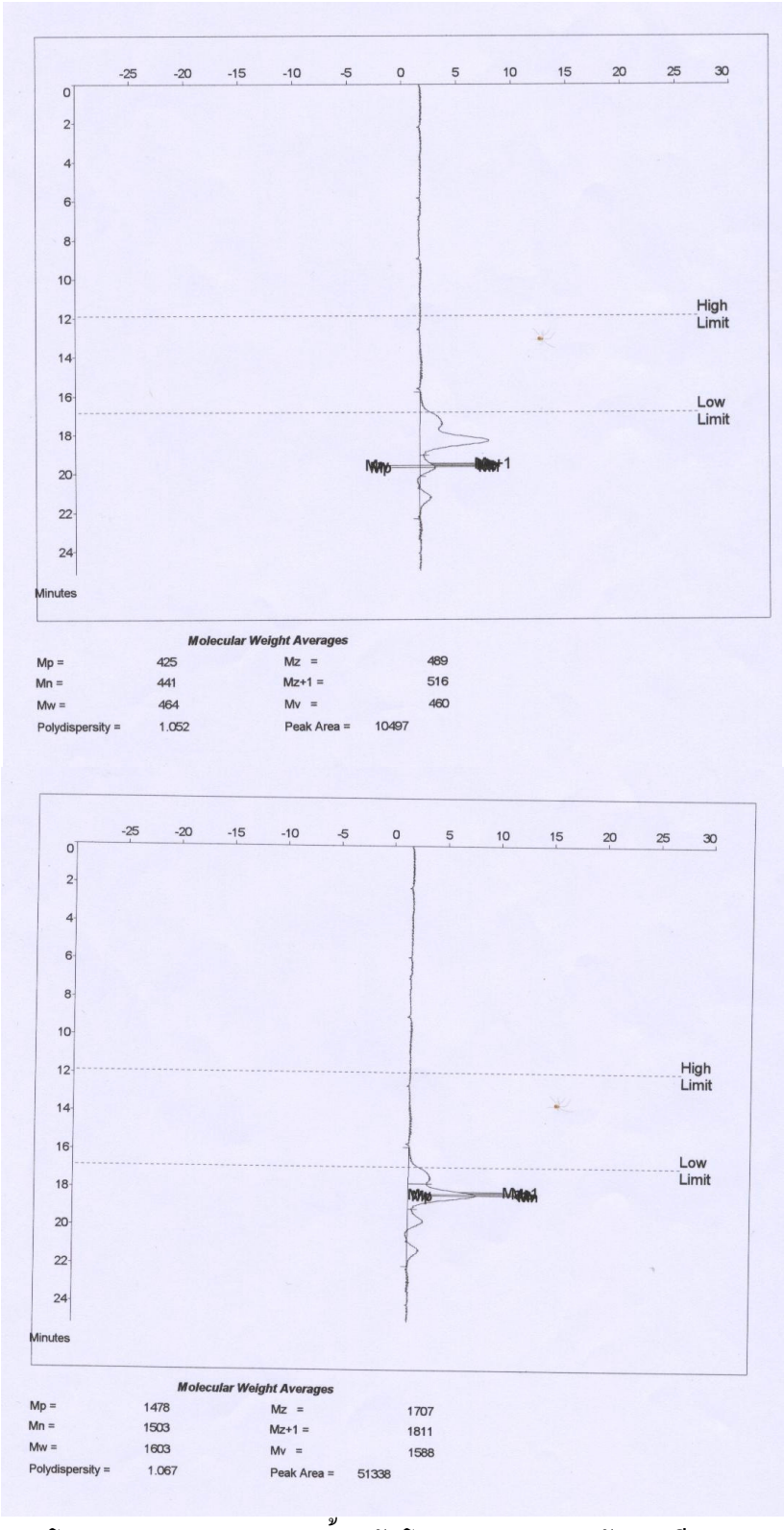
ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ A) อะซิติก B) โพรพิโอนิก C) ไอโซ บิวเทอริก และ D) บิวเทอริก

Figure 31. Standard curve of A) acetic; B) propionic; C) i-butyric and D) butyric.



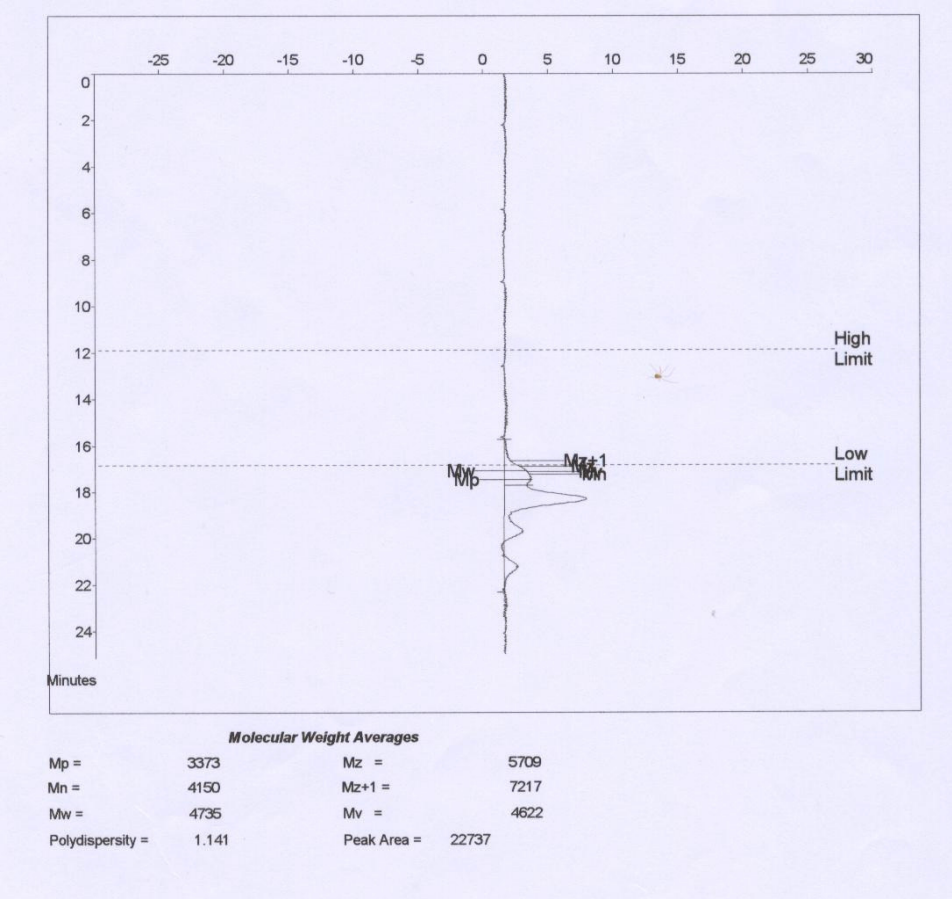
ภาพที่ 32 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง

Figure 32. GPC chromatogram of red sweet potato extracts.



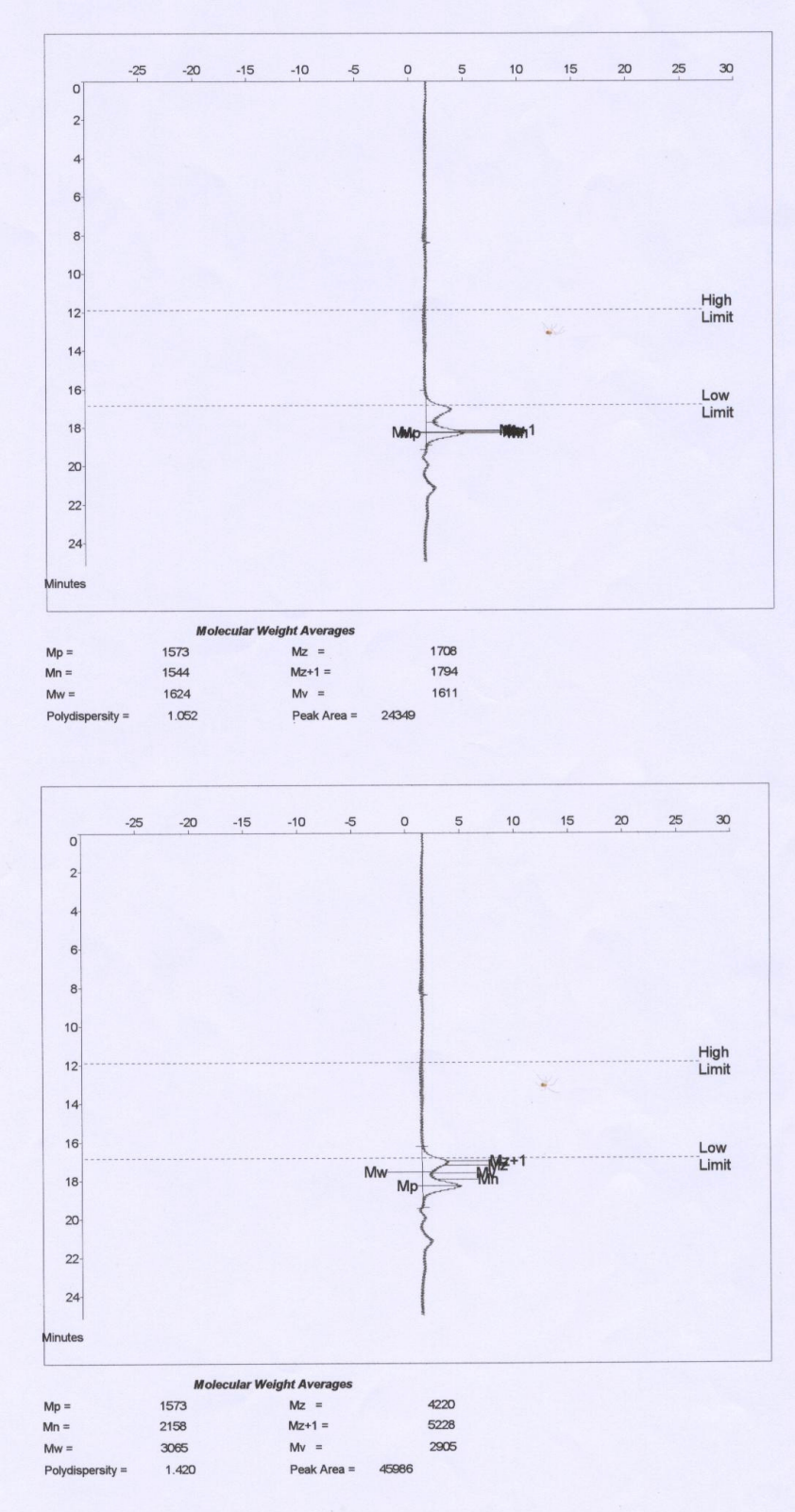
ภาพที่ 33 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากบีทรูท

Figure 33. GPC chromatogram of beetroot extracts.



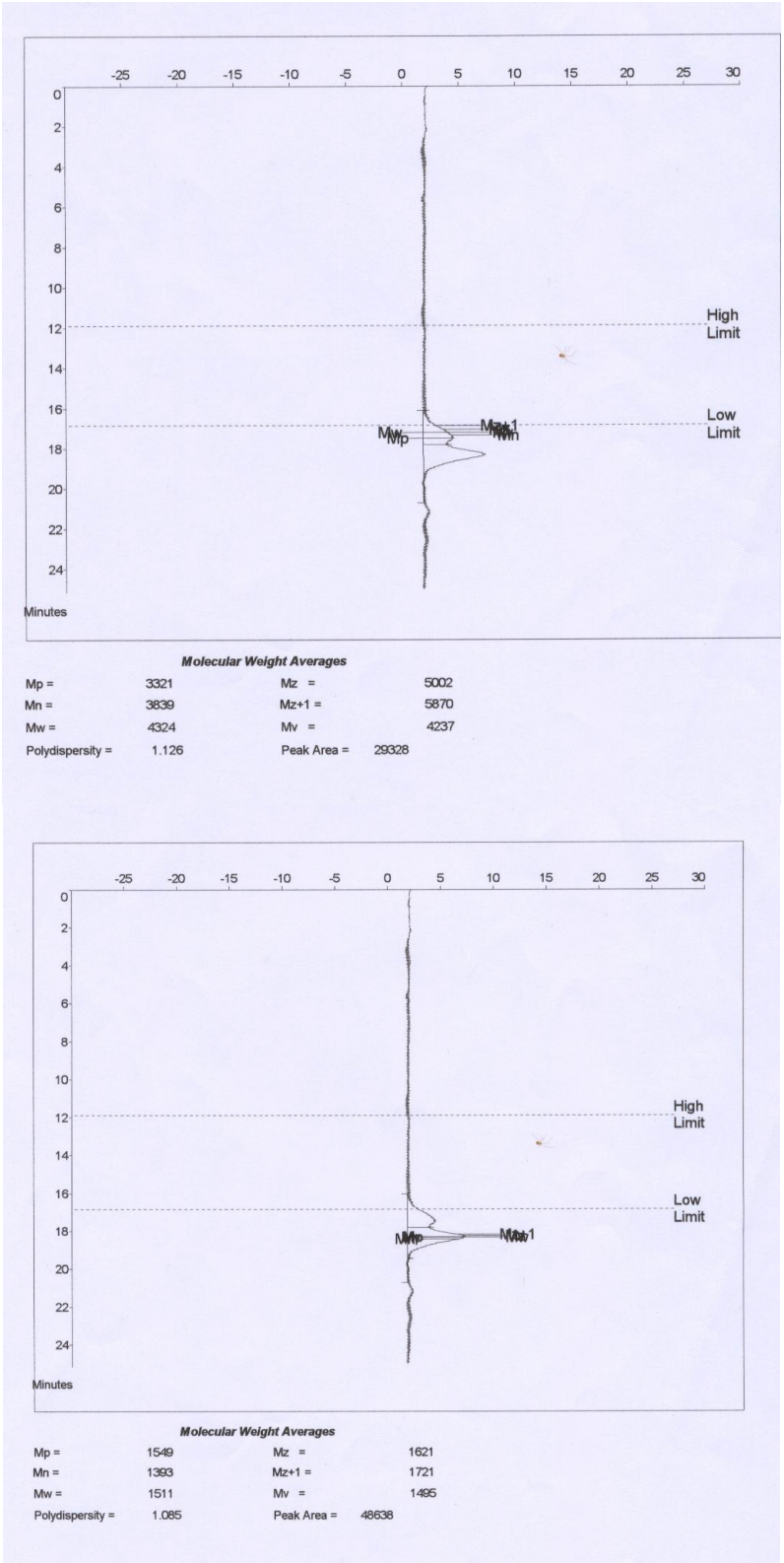
ภาพที่ 33 (ต่อ)

Figure 33. (Cont.).



ภาพที่ 34 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากมันฝรั่ง

Figure 34. GPC chromatogram of potato extracts.



ภาพที่ 35 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง

Figure 35.GPC chromatogram of purple sweet potato extracts.

ภาคผนวก ค
วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

1.1 จุลินทรีย์ก่อโรค

เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย แล้วบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำเชื้อในระยะนี้มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของ EPSs โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

1.2 การนับเซลล์ด้วย hemacytometer สำหรับ *B. Bifidum*

ปริมาตรของช่องใหญ่ของ hemacytometer = 0.2 มิลลิเมตร × 0.2 มิลลิเมตร × 0.1 มิลลิเมตร

$= 4 \times 10^{-3}$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

คิดเป็น 4×10^{-3} ลูกบาศก์มิลลิเมตร $\times \frac{1 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร}}{10^3 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร}} = 4 \times 10^{-6}$ ลูกบาศก์เซนติเมตร

$= 4 \times 10^{-6}$ มิลลิลิตร

ถ้านับได้ A เซลล์ในช่องใหญ่แสดงว่า ปริมาตร 4×10^{-6} มิลลิลิตร มี A เซลล์

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เซลล์ $= \frac{A}{4 \times 10^{-6}}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.3 แบคทีเรียโปรไบโอติก

ในกรณีของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เขี่ยเชื้อจาก stock culture มา 1 ลูปใส่ลงในอาหาร MRS เหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อลงปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร MRS เหลว ปริมาตร 9 มิลลิลิตรบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมงจะทำให้ได้จำนวนเชื้อ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตรในกรณีของ B. bifiduum ให้ดูดเชื้อจาก stock culture มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร M58 เหลวนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการถ่ายเชื้อลงในอาหาร M58 อีกครั้งแล้วบ่มต่อเป็นเวลา 18 ชั่วโมงจะได้เชื้อปริมาณ 10^7 cell/ml

1.4 การนับจำนวนจุลินทรีย์

ในการนับจำนวนจุลินทรีย์จะนำอาหารเลี้ยงที่เลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ มาเจือจางจนถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อแต่ชนิด แล้ว spread plate บนอาหาร MRS สำหรับแบคทีเรียแลคติกและเลี้ยงที่สภาวะไร้อากาศโดยเลี้ยงใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียก่อโรคเลี้ยงบนอาหาร MHA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนับจำนวนโคโลนี แล้วรายงานผลเป็น CFU ต่อมิลลิลิตร

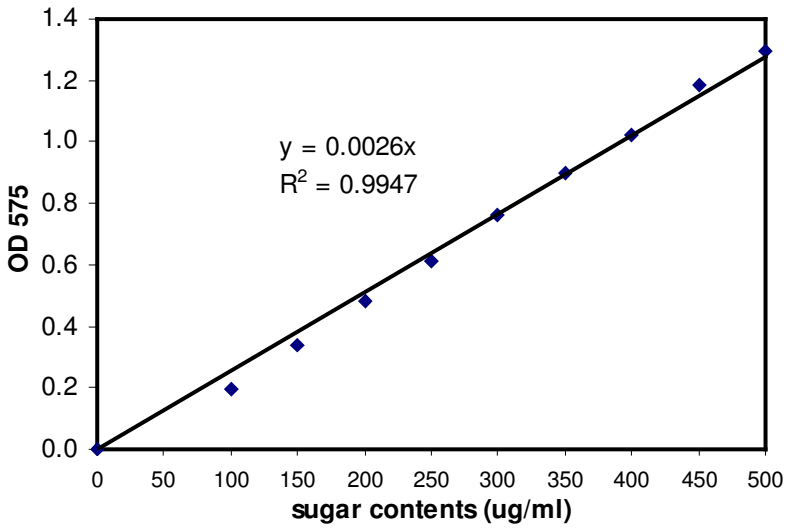
2. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al*., 2001)

การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมสารละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วยพลาสติกใส (polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิป (plastic zipper bag) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง micriplate reader นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วยพลาสติกใส (Polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิป (plastic zipper bag) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐาน

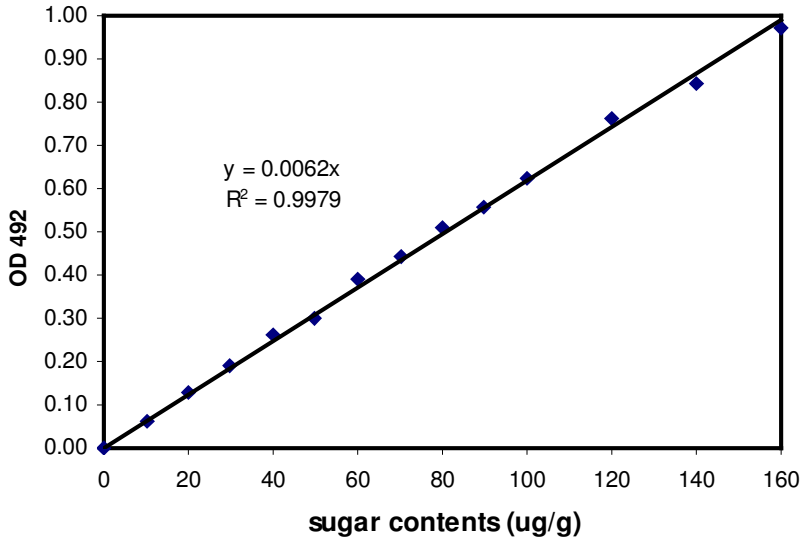


ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำรีดิวซ์

Figure36. Standard curve of reducing sugar.

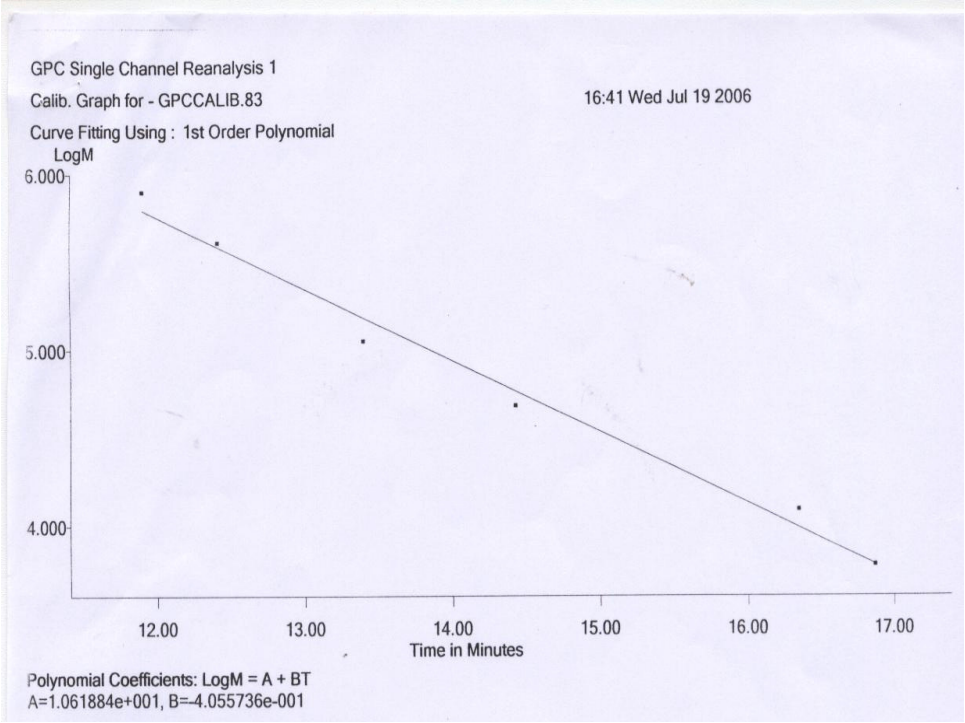
3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยใช้วิธี Modified phenol sulfuric method (Fox and Robyt, 1991)

เติมตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท และเติม 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) phenol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที) นำไมโครไตเตอร์เพลทวางบนก้อนน้ำแข็ง และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที) หุ้มไมโครไตเตอร์เพลทด้วยพลาสติกใส และนำไปใส่ในถุงซิป (plastic zipper bag) นำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เทียบค่าการดูดกลืนแสง. ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคส



ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

Figure37. Standard curve of total sugar.



ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของ pullulan วิเคราะห์ โดย GPC

Figure 38. GPC chromatogram of pullulan (standard curve)

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้ 16s rRNA

การสกัด DNA เลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS broth ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซ็นตริฟิวซ์ (centrifuged) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย TE-buffer 2 ครั้ง และนำตะกอนมาละลายด้วย TE-buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปเซ็นตริฟิวซ์ (centrifuged) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลาย DNA ที่ได้ (DNA template) ไป amplified โดยการทำ PCR ใช้ primer UFUL และ URUL ซึ่งในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 10xPCR buffer pH 8.8 (10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100) สำหรับ Taq DNA polymerase (BioLab), 2 mM ของ deoxynucleoside triphosphate (dNTP), primer แต่ละชนิด 0.4 μM และใช้ 1 ยูนิตของ Taq polymerase ปรับปริมาตรให้ได้ 20 ไมโครลิตร ซึ่งใช้ความร้อนเริ่มต้น(thermocycle) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 30 รอบ ที่ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที และใช้อุณหภูมิสุดท้าย 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำตัวอย่างที่ได้ (16S rRNA gene amplicons)ไปทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเอทานอลโดยใช้สารละลาย DNA 80 ไมโครลิตร น้ำ 14.5 ไมโครลิตร เอทานอล 62.5 ไมโครลิตร และ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทพีเอช 4.6 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปเซ็นตริฟิวส์ที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และนำไปเซ็นตริฟิวส์อีกครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน Hi-Di Formamide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ทำปฏิกิริยา DNA sequencing PCR โดยใช้ Big Dye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit (Master Mix) โดยใช้ primer UFUL และ URUL ซึ่งใช้ความร้อนเริ่มต้น (thermocycle) ในการทำ DNA Sequencing PCR cycle 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 30 รอบ ที่ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที และใช้อุณหภูมิสุดท้าย 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (Biosystems GeneScan 3700, Foster City, CA) นำลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลในอินเตอร์เน็ตโดยใช้เวปไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nih.gov โดยใช้โปรแกรม BLAST