ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. minimal medium (Fooksa, *et al*., 2003)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
peptone water	2.0
yeast extract	2.0
NaCl	0.1
K_2HPO_4	0.04
KH_2PO4,	0.04
$CaCl_2$ _ $6H_20$	0.01
$NaHCO_3$	2.0
$MgSO_4$ _ $7H_20$	0.01
bile salts	0.5
Tween 80	2 ml
hemin	0.05
cysteine–HCl	0.5

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามอัตราส่วนที่ระบุไว้ข้างต้นละลายในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือด หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติม cystein-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.9 ดูดอาหารใส่ขวดนำไปพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนและปิดด้วย septum และฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที

2. De Man Rogosa Sharpe (MRS)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
Dipotassium phosphate	10.00
Beef extract	2.00
Yeast extract	5.00
Dextrose	20.00
Polysorbate 80	1.00 ml/l
Ammonium citrate	2 .00
Sodium acetate	5.00
Magnesium sulphate	0.10
Manganese sulphate	0.05
Proteose peptone	10.00

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 52 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Mueller Hinton Agar

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
Beef infusion	300
Casein acid hydrolysate	7.50
Starch	1.50
Agar	17.00

วิธีการเตรียม

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

4. M 58 medium

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Casien peptone, tryptic digest	10.0
Yeast extract	5.0
Meat extract	5.0
Bacto soytone	5.0
Glucose	10.0
K_2HPO_4	2.0
$MgSO_4$. 7 H_2O	0.2
$MnSO_4$. H_2O	0.05
Tween 80	1.0
NaCl	5.0
Salt solution	40 ml.
Resazurin (25 mg/100ml)	4 ml.
Distill water	950 ml.
<u>Salt solution</u>	
$CaCl_2$. 2 H2O	0.25
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.50
K_2HPO_4	1.0
NaHCO3	10.0
NaCl	2.0
Distilled water	1000.0 ml.

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีในอัตราส่วนที่กำหนด ผสมให้ละลายเข้ากัน ต้มให้เดือด แล้วตั้งให้เย็นแล้วจึงเติม L- cysteine ปรับพีเอชเป็น 6.8 โดย 8 N NaOH บรรจุในขวดที่มีฝาเป็นศูนย์ยากาศ พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. องค์ประกอบของ HCl buffer (g/l)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
NaCl	8.00
KCl	0.20
$CaCl_2 2H_2O$	0.10
NaH_2PO_4	14.35
$MgCl_2\ 6H_2O$	0.18
$Na_2HPO_4\ 2H_2O$	8.25
HCl 5 M	

4. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Copper-bicinchoninate (Foxand Robyt,1991)

Solution A

1.ชั่ง Sodium carbonate 2.74 กรัม

2.ชั่ง Sodium bicarbonate 1.2 กรัม

3.ละลายในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร

4.เติม disodium 2,2 –bicinchoninate 97.1 มิลลิกรัม

5.ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

Solution B

1.ชั่ง Copper sulfate pentahydrate 62 มิลลิกรัม

2.ชั่ง L-serine 63 มิลลิกรัม

3.ละลายในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร

4.ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

Solution C

ผสม Solution A และ Solution B ในอัตราส่วนที่เท่ากันเมื่อใช้ละลาย กลูโคสความเข้มข้น 1-10 µg/ml เป็นสารละลายมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Copper-bicinchoninate (Foxand Robyt,1991)

1.ดูดสารละลาย C ใส่ในหลุมของจานหลุม หลุมละ 100 µl

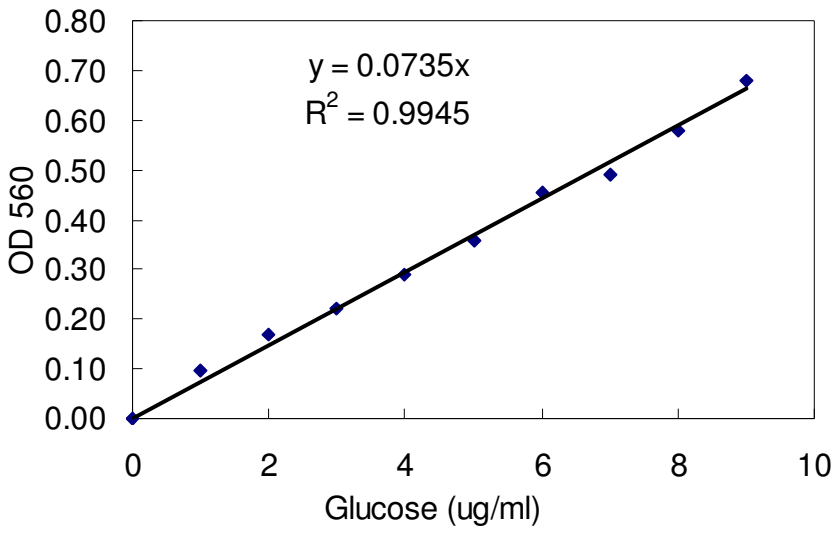
2.เติมสารละลายตัวอย่าง 100 µl

3.ปิดจานหลุมด้วย wrap และใส่ในถุงซิบ

4.บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 35 นาที

5.ทำให้เย็นเป็นเวลา 15 นาที

6.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร



ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐานกลูโคส การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Copper-bicinchoninate

Figure 23. Standard curve of reducing sugar analyzed by Copper-bicinchoninate method.

2. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้ Phenol sulfuric acid method (Fox and Robyt, 1991)

1. เติมตัวอย่างปริมาณ 25 ul ลงใน 96 - well micro titer plate

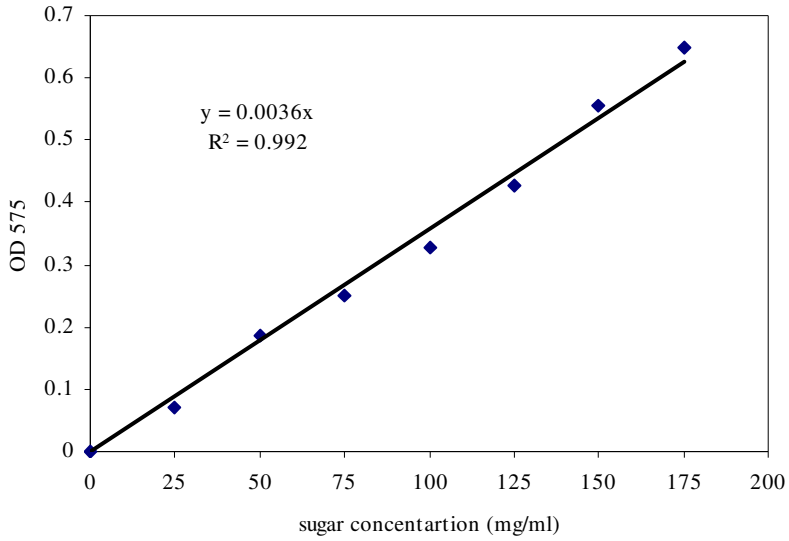
2. เติม 5 % (w/v) phenol ปริมาณ 25 ul

3. เขย่าให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที)

4. นำ Microtiter plate วางบนน้ำแข็ง และเติม H_2SO_4 เข้มข้นปริมาณ 125 ul

5. ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที)

6. ใส่ใน plastic zipper bag แล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นและนำไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐาน การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric acid

Figure 24. Standard curve of total sugar analyzed by phenol-sulfuric acid method.

3. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

3.1 จุลินทรีย์ก่อโรค

เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย และ YM สำหรับยีสต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำเชื้อในระยะนี้มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของ EPSs โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราเตรียมโดยการเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยใช้น้ำที่ผสม tween 80 ปริมาณร้อยละ 1 ปลอดเชื้อเทใส่จานเพาะ

เชื้อรา แล้วใช้แท่งแก้วคนปลอดเชื้อขูดผิวหน้าอาหารให้สปอร์ออกมาชะล้างกับน้ำ กรองผ่านกรวยแก้วที่มีสำลีปลอดเชื้อเพื่อแยกเส้นใยออกจากสปอร์จะได้สารแขวนลอยสปอร์ แล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemacytometer ปรับให้ได้ปริมาณสปอร์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารPDBเจือจาง

4. การนับเซลล์ด้วย hemacytometer

ปริมาตรของช่องใหญ่ของ hemacytometer = 0.2 มิลลิเมตร × 0.2 มิลลิเมตร × 0.1 มิลลิเมตร

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

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

$= 4 \times 10^{-6}$ มิลลิลิตร

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

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

3.2 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

5. การหาการรอดชีวิตของ *B. bifidum* โดยใช้ LIVE/DEAD BacLightTH Bacterial Viability kits

องค์ประกอบของชุดการทดสอบ

สาร A SYTO9 dye, 1.67 mM/propidium iodine, 1.67 mM

สาร B SYTO9 dye, 1.67 mM/propidium iodine, 18.3 mM

ขั้นตอนการทดสอบ

1. ผสมส่วนผสม A และ B เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1
2. เติมส่วนผสมในข้อ1ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

4. หยดส่วนผสมลงบนสไลด์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วปิดด้วย coverslip
5. นำมาส่องด้วยกล้อง Fluorescent

การอ่านผล

จากหลักการของสีที่ใช้ในการย้อมนั้น พบว่า สี SYTO 9 มีความสามารถในการติดทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายและแสดงออกมาเป็นสีเขียวเมื่อส่องด้วยกล้อง Fluorescent ในขณะที่ สี Propidium iodine จะย้อมติดเฉพาะ เซลล์ตายเท่านั้นและแสดงออกมาเป็นสีแดงเมื่อส่องด้วยกล้อง Fluorescent ดังนั้นการนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตจึงทำได้โดยการหาผลต่างระหว่างเซลล์ที่ติดสีทั้งสอง คือจะนับเพียงเซลล์ที่เห็นเป็นสีเขียวโดยที่ไม่ติดสีแดง

การคำนวณ

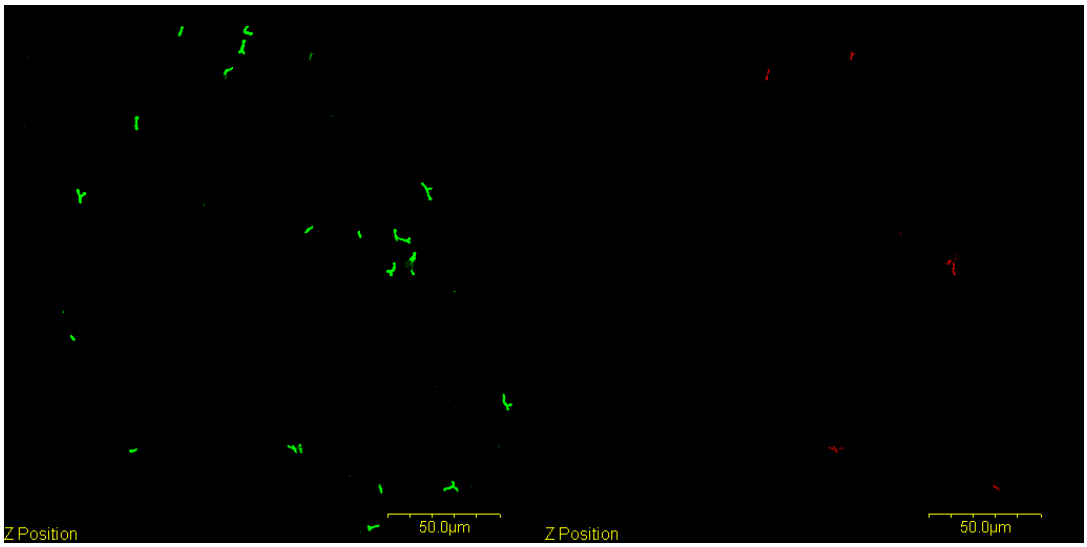
พื้นที่ที่ใช้นับเซลล์ภายใต้กล้อง = 5.71×10^{-4} ตารางเซนติเมตร

พื้นที่ทั้งหมดที่นับเซลล์(ขนาด cover slipe) = 4.84 ตารางเซนติเมตร

จากพื้นที่ 4.84 ตารางเซนติเมตร คิดเป็นปริมาตร 10 ไมโครลิตร

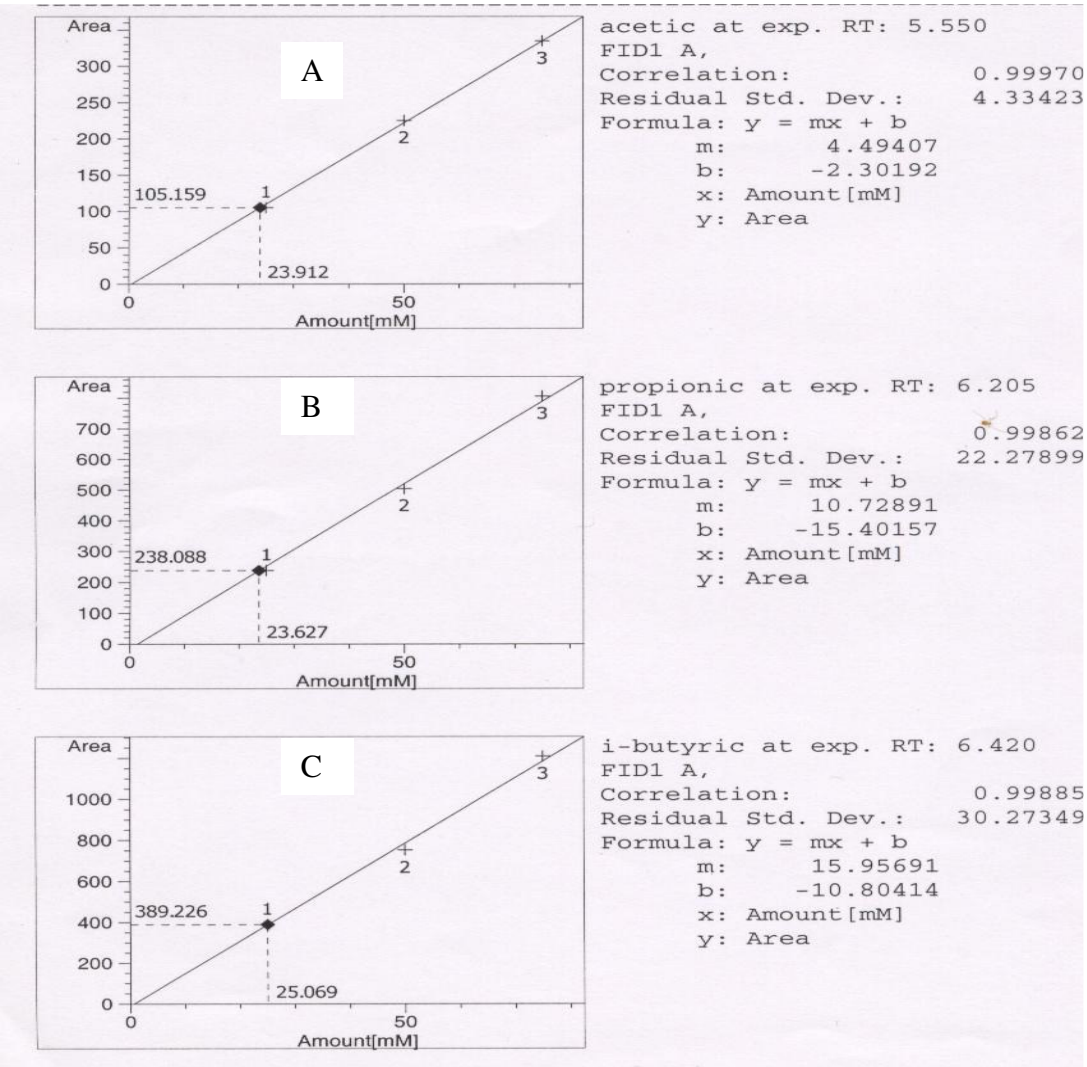
ถ้านับเซลล์ภายใต้กล้องได้ A เซลล์ จะมีจำนวนเซลล์

$$= \frac{A \times 4.84 \times 10^{4}}{5.71} \times \frac{1000}{10} \quad \text{cellต่อมิลลิลิตร}$$



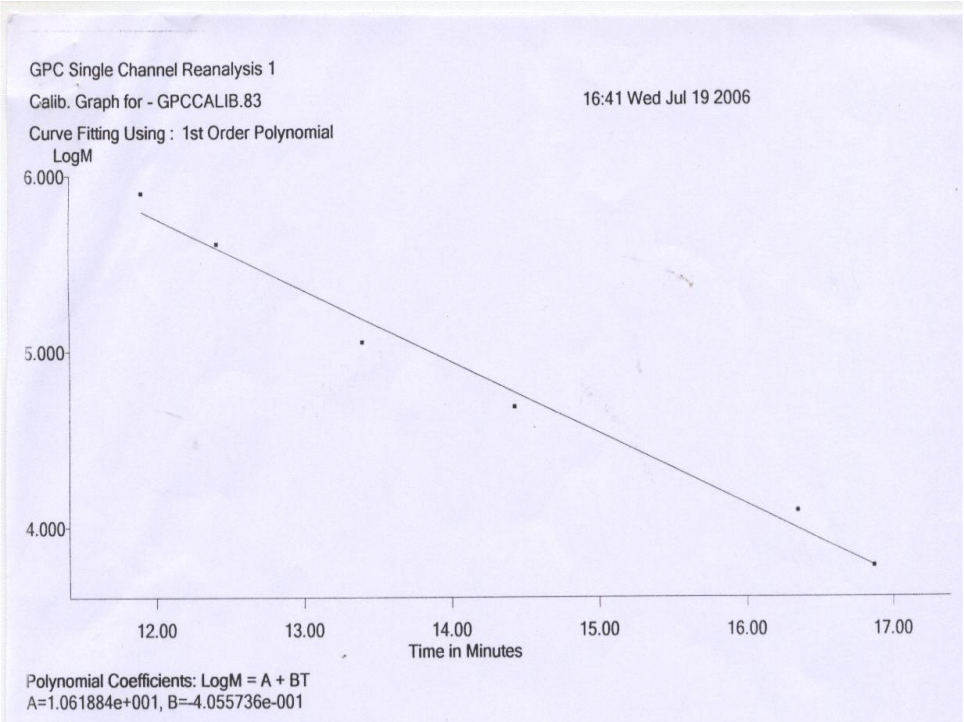
ภาพที่ 25 การหาการรอดชีวิตของ *B. bifidum* โดยใช้ชุดทดสอบ LIVE/DEAD BacLightTH โดยกล้อง Confocol scanning laser microscopy

Figure25. Confocol scanning laser microscopy of *B. bifidum* by LIVE/DEAD BacLightTH viability strain.



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานของ ปริมาณ (A) กรดอะซิติก (B) โพรพิออนิก และ (C) บิวทาริก วิเคราะห์โดย GC-FID

Figure 26. Standard curve of (A) acetic acid (B) propionic acid and (C) butyric acid analyzed by GC-FID.



ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของ pullulan วิเคราะห์ โดย GPC

Figure 27 GPC chromatogram of pullulan (standard curve).

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่17 การย่อยสลายด้วยกรดของ EPSs ชนิดต่างๆที่พีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Table 17 Acid hydrolysis of EPSs at pH 1 for 4 h.

Time (h)	Acid hydrolysis (%) of EPSs produced by			
	W. cibaria A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4
0	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
1	0.348 ± 0.027	2.163 ± 0.206	0.184 ± 0.070	1.309 ± 0.020
2	0.137 ± 0.012	2.504 ± 0.007	0.315 ± 0.026	1.203 ± 0.025
3	0.048 ± 0.010	2.070 ± 0.493	0.467 ± 0.139	0.535 ± 0.004
4	0.251 ± 0. 070	1.913 ± 0.016	0.547 ± 0.050	0.759 ± 0.179

ตารางที่18 การย่อยสลายด้วยกรดของ EPSs ชนิดต่างๆที่พีเอช 2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Table18. Acid hydrolysis of EPSs at pH 2 for 4 h.

Time	Acidic hydrolysis (%) of EPSs produced by			
	W. cibaria A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4
0	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00
1	0.150±0.017	1.341±0.285	0.114±0.017	0.508±0.055
2	0.200±0.046	1.233±0.258	0.265±0.033	0.620±0.033
3	0.042±0.008	1.475±0.135	0.315±0.008	0.478±0.052
4	0.163±0.030	1.505±0.290	0.256±0.002	0.583±0.019

ตารางที่19 การย่อยสลายด้วยกรดของ EPSs ชนิดต่างๆที่พีเอช 3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
Table 19 Acidic hydrolysis of EPSs at pH3 for 4 h.

Time	Acidic hydrolysis (%) of EPSs produced by			
	W. cibaria A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
1	0.110 ± 0.066	1.550 ± 0.030	0.153 ± 0.032	0.523 ± 0.003
2	0.221 ± 0.016	1.940 ± 0.080	0.436 ± 0.024	0.418 ± 0.011
3	0.038 ± 0.009	1.567 ± 0.105	0.335 ± 0.031	0.404 ± 0.010
4	0.213 ± 0.021	1.649 ± 0.121	0.226 ± 0.011	0.786 ± 0.124

ตารางที่20 การเจริญของ *L. plantarum* (OD_{660}) ในอาหาร minimal medium ที่ใช้ EPSs ชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 20 Growth of *L. plantarum* in minimal medium used EPSs as carbon sources for 72 h.

Time (h)/ C-Sources	*W. cibaria* A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4	Glucose	No C-source
0	0.247 ± 0.004	0.201 ± 0.001	0.210 ± 0.001	0.210 ± 0.003	0.234 ± 0.007	0.228 ± 0.008
6	0.253 ± 0.003	0.200 ± 0.003	0.216 ± 0.003	0.231 ± 0.004	0.658 ± 0.004	0.302 ± 0.010
12	0.258 ± 0.001	0.202 ± 0.004	0.239 ± 0.001	0.239 ± 0.002	0.972 ± 0.046	0.313 ± 0.003
24	0.263 ± 0.002	0.210 ± 0.008	0.271 ± 0.002	0.247 ± 0.001	0.995 ± 0.007	0.315 ± 0.001
48	0.260 ± 0.002	0.213 ± 0.035	0.313 ± 0.001	0.267 ± 0.014	1.090 ± 0.004	0.316 ± 0.003
72	0.264 ± 0.001	0.214 ± 0.010	0.332 ± 0.001	0.273 ± 0.008	1.096 ± 0.003	0.319 ± 0.001

ตารางที่21 การเจริญของ *L. acidophilus* ในอาหาร minimal medium ที่ใช้ EPSs ชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 21 Growth of *L. acidophilus* in minimal medium used EPSs as carbon sources for 72 h.

Time(h)/ C-Sources	*W. cibaria* A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4	Glucose	No C-source
0	0.236 ± 0.008	0.200 ± 0.004	0.200 ± 0.058	0.200 ± 0.011	0.200 ± 0.028	0.200 ± 0.016
6	0.353 ± 0.032	0.340 ± 0.005	0.250 ± 0.002	0.226 ± 0.004	0.495 ± 0.061	0.296 ± 0.010
12	0.362 ± 0.028	0.358 ± 0.006	0.353 ± 0.003	0.331 ± 0.003	0.696 ± 0.026	0.388 ± 0.001
24	0.280 ± 0.041	0.356 ± 0.050	0.342 ± 0.005	0.359 ± 0.003	0.723 ± 0.021	0.394 ± 0.006
48	0.370 ± 0.011	0.386 ± 0.008	0.320 ± 0.004	0.398 ± 0.001	0.926 ± 0.018	0.396 ± 0.001
72	0.370 ± 0.007	0.390 ± 0.002	0.314 ± 0.006	0.397 ± 0.001	1.020 ± 0.006	0.385 ± 0.014

ตารางที่22 การเจริญของ *B. bifidum* ในอาหาร minimal medium ที่ใช้ EPSs ชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 22. Growth of *B. bifidum* (log cell/ml) used EPSs as carbon sources in minimal medium for 72 h.

Time(h)	Sources of EPSs				
	W. cibaria A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4	Glucose
0	6.17 ± 0.07	6.14 ± 0.06	6.12 ± 0.04	6.14 ± 0.06	6.08 ± 0.02
6	6.62 ± 0.05	6.98 ± 0.06	6.89 ± 0.07	6.88 ± 0.12	6.87 ± 0.12
12	7.22 ± 0.02	7.16 ± 0.01	7.16 ± 0.05	7.07 ± 0.12	7.25 ± 0.04
24	7.42 ± 0.06	7.30 ± 0.08	7.31 ± 0.04	7.09 ± 0.15	7.35 ± 0.07
48	7.45 ± 0.10	7.38 ± 0.01	7.32 ± 0.04	7.12 ± 0.02	7.28 ± 0.04
72	7.54 ± 0.06	7.34 ± 0.09	7.30 ± 0.03	7.28 ± 0.02	7.32 ± 0.01

102

ตารางที่23 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *B. bifudum* ในอาหาร minimal medium ที่เติม EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 72 ชั่วโมง

Table 23 pH value of *B. bifibum* growth in minimal medium contained EPSs as carbon sources for 72 h.

Time(h)/C-Sources	*W. cibaria* A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4	Glucose
0	6.960 ± 0.057	6.600 ± 0.000	6.715 ± 0.021	6.905 ± 0.092	6.975 ± 0.007
6	6.760 ± 0.021	6.485 ± 0.021	6.680 ± 0.014	6.750 ± 0.028	6.570 ± 0.042
12	4.840 ± 0.849	5.915 ± 0.007	5.950 ± 0.014	6.620 ± 0.127	6.160 ± 0.057
24	5.310 ± 0.021	5.445 ± 0.007	5.420 ± 0.028	5.970 ± 0.325	5.185 ± 0.092
48	5.290 ± 0.028	5.210 ± 0.014	5.185 ± 0.021	5.360 ± 0.297	4.955 ± 0.021
72	5.180 ± 0.092	5.155 ± 0.007	5.125 ± 0.021	5.245 ± 0.191	4.830 ± 0.014

ตารางที่24 ร้อยละของการนำ EPSs ใช้ในการเจริญของ *B. bifidum*

Table 24. EPSs utilization by *B. bifidum* in minimal medium.

Time (h)/ C-sources	*W. cibaria* A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P. pentosaceus* 5S4	Glucose
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
6	18.024 ± 0.529	26.945 ± 0.164	26.577 ± 0.473	6.081 ± 2.310	14.314 ± 2.820
12	15.419 ± 1.504	30.383 ± 4.928	29.954 ± 0.926	8.643 ± 0.114	15.893 ± 0.358
24	30.798 ± 8.789	38.629 ± 0.821	31.413 ± 2.613	16.532 ± 1.799	17.150 ± 0.650
48	34.128 ± 0.032	42.079 ± 2.185	35.915 ± 4.876	25.959 ± 0.260	21.100 ± 1.889
72	33.996 ± 2.339	42.195 ± 3.564	43.577 ± 0.866	39.979 ± 0.098	33.628 ± 2.929

103

ตารางที่25 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *E. coli* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 25. Co-culture of *E. coli* and *B. bifidum* used EPSs produced by *P. pentosaceus* 5S4 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *E. coli* (Log CFU/ml)		
	E. coli + *B. bifidum*	*E. coli* alone	*E. coli* (No C-sources)
0	4.85 ± 0.01	5.35 ± 0.72	4.22 ± 0.14
12	6.76 ± 0.02	6.81 ± 0.01	5.31 ± 0.01
24	8.65 ± 0.08	9.25 ± 0.32	6.17 ± 0.04
48	7.77 ± 0.01	7.83 ± 0.18	5.86 ± 0.03
72	7.41 ± 0.02	7.41 ± 0.01	5.45 ± 0.03

ตารางที่26 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Stap. aureus* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 26. Co-culture of *Stap. aureus* and *B. bifidum* used EPSs produced by *P. pentosaceus* 5S4 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Stap. aureus* (Log CFU/ml)		
	Stap. aureus + *B. bifidum*	*Stap. aureus* alone	*Stap. aureus* (No C-sources)
0	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.06 ± 0.04
12	6.84 ± 0.09	6.69 ± 0.12	6.35 ± 0.07
24	9.48 ± 0.00	8.16 ± 0.44	6.93 ± 0.15
48	7.94 ± 0.01	7.83 ± 0.02	7.24 ± 0.07
72	7.66 ± 0.04	7.54 ± 0.09	7.29 ± 0.01

ตารางที่27 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Sal. typhi* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 27. Co-culture of *Sal. typhi* and *B. bifidum* used EPSs produced by *P. pentosaceus* 5S4 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Sal. typhi* (Log CFU/ml)		
	Sal. typhi + *B. bifidum*	*Sal. typhi* alone	*Sal. typhi* (No C-source)
0	4.65 ± 0.07	4.20 ± 0.28	4.34 ± 0.06
12	6.70 ± 0.05	6.67 ± 0.10	6.39 ± 0.12
24	8.58 ± 0.04	9.39 ± 0.12	6.51 ± 0.05
48	7.98 ± 0.03	7.85 ± 0.01	6.40 ± 0.02
72	7.50 ± 0.10	7.51 ± 0.05	5.90 ± 0.13

ตารางที่28 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *E. coli* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 28. Co-culture of *E. coli* and *B. bifidum* used EPSs produced by *L. plantarum* A3 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *E. coli* (Log CFU/ml)		
	E. coli + *B. bifidum*	*E. coli* alone	*E. coli* (No C-source)
0	4.74 ± 0.06	5.35 ± 0.72	4.72 ± 0.03
12	6.76 ± 0.03	6.81 ± 0.01	6.72 ± 0.03
24	5.74 ± 0.06	9.25 ± 0.32	6.72 ± 0.02
48	7.17 ± 0.73	7.83 ± 0.18	6.54 ± 0.05
72	5.76 ± 0.02	7.41 ± 0.01	6.17 ± 0.02

ตารางที่ 29 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Stap. aureus* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 29. Co-culture of *Stap. aureus* and *B. bifidum* used EPSs produced by *L. plantarum* A3 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Stap. aureus* (Log CFU/ml)		
	Stap. aureus + *B. bifidum*	*Stap. aureus* alone	*Stap. aureus* (No C-source)
0	4.15 ± 0.21	4.24 ± 0.34	4.06 ± 0.04
12	6.57 ± 0.04	6.52 ± 0.04	6.35 ± 0.07
24	7.36 ± 0.05	6.50 ± 0.04	6.93 ± 0.15
48	7.46 ± 0.02	7.53 ± 0.07	7.24 ± 0.07
72	7.47 ± 0.01	7.52 ± 0.06	7.29 ± 0.01

ตารางที่ 30 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Sal. typhi* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 30. Co-culture of *Sal. typhi* and *B. bifidum* used EPSs produced by *L. plantarum* A3 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Sal. typhi* (Log CFU/ml)		
	Sal. typhi + *B. bifidum*	*Sal. typhi* alone	*Sal. typhi* (No C-source)
0	4.18 ± 0.04	4.28 ± 0.03	4.34 ± 0.06
12	6.54 ± 0.05	6.80 ± 0.03	6.39 ± 0.12
24	6.53 ± 0.08	7.46 ± 0.02	6.51 ± 0.05
48	6.50 ± 0.04	6.51 ± 0.05	6.40 ± 0.02
72	5.77 ± 0.02	5.71 ± 0.02	5.90 ± 0.13

ตารางที่31 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *E. coli* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 31. Co-culture of *E. coli* and *B. bifidum* used EPSs produced by *W. confusa* A9 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *E. coli* (Log CFU/ml)		
	E. coli + *B. bifidum*	*E. coli* alone	*E. coli* (No C- source)
0	4.85 ± 0.00	4.85 ± 0.00	4.22 ± 0.14
12	6.72 ± 0.03	6.72 ± 0.02	5.31 ± 0.01
24	9.57 ± 0.04	8.13 ± 0.07	6.17 ± 0.04
48	7.48 ± 0.67	7.81 ± 0.05	5.86 ± 0.03
72	7.68 ± 0.03	7.02 ± 0.15	5.45 ± 0.03

ตารางที่ 32 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Stap. aureus* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 32. Co-culture of *Stap. aureus* and *B. bifidum* used EPSs produced by *W. confusa* A9 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Stap. aureus* (Log CFU/ml)		
	Stap. aureus + *B. bifidum*	*Stap. aureus* alone	*Stap. aureus* (No C-source)
0	4.00 ± 0.00	4.85 ± 0.00	4.06 ± 0.04
12	5.18 ± 1.43	6.72 ± 0.03	6.35 ± 0.07
24	9.02 ± 0.05	8.63 ± 0.03	6.93 ± 0.15
48	7.95 ± 0.00	7.81 ± 0.04	7.24 ± 0.07
72	7.76 ± 0.09	7.94 ± 0.02	7.29 ± 0.01

ตารางที่33 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Sal. typhi* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 33. Co-culture of *Sal. typhi* and *B. bifidum* used EPSs produced by *W. confusa* A9 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Sal. typhi* (Log CFU/ml)		
	Sal. typhi + *B. bifidum*	*Sal. typhi* alone	*Sal. typhi* (No C-source)
0	4.46 ± 0.54	4.00 ± 0.00	4.34 ± 0.06
12	6.68 ± 0.03	6.75 ± 0.07	6.39 ± 0.12
24	8.90 ± 0.09	8.16 ± 0.44	6.51 ± 0.05
48	7.76 ± 0.03	7.83 ± 0.02	6.40 ± 0.02
72	7.60 ± 0.01	7.54 ± 0.09	5.90 ± 0.13

ตารางที่34 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *E. coli* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 34. Co-culture of *E. coli* and *B. bifidum* used EPSs produced by *W. cibaria* A2 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *E. coli* (Log CFU/ml)		
	E. coli + *B. bifidum*	*E. coli* alone	*E. coli* (No C-source)
0	4.59 ± 0.16	4.77 ± 0.10	4.22 ± 0.14
12	4.85 ± 0.01	6.54 ± 0.09	5.31 ± 0.01
24	8.80 ± 0.01	8.16 ± 0.20	6.17 ± 0.04
48	7.76 ± 0.03	7.51 ± 0.05	5.86 ± 0.03
72	7.15 ± 0.21	7.32 ± 0.12	5.45 ± 0.03

ตารางที่ 35 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Stap. aureus* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 เป็นแหล่งคาร์บอน

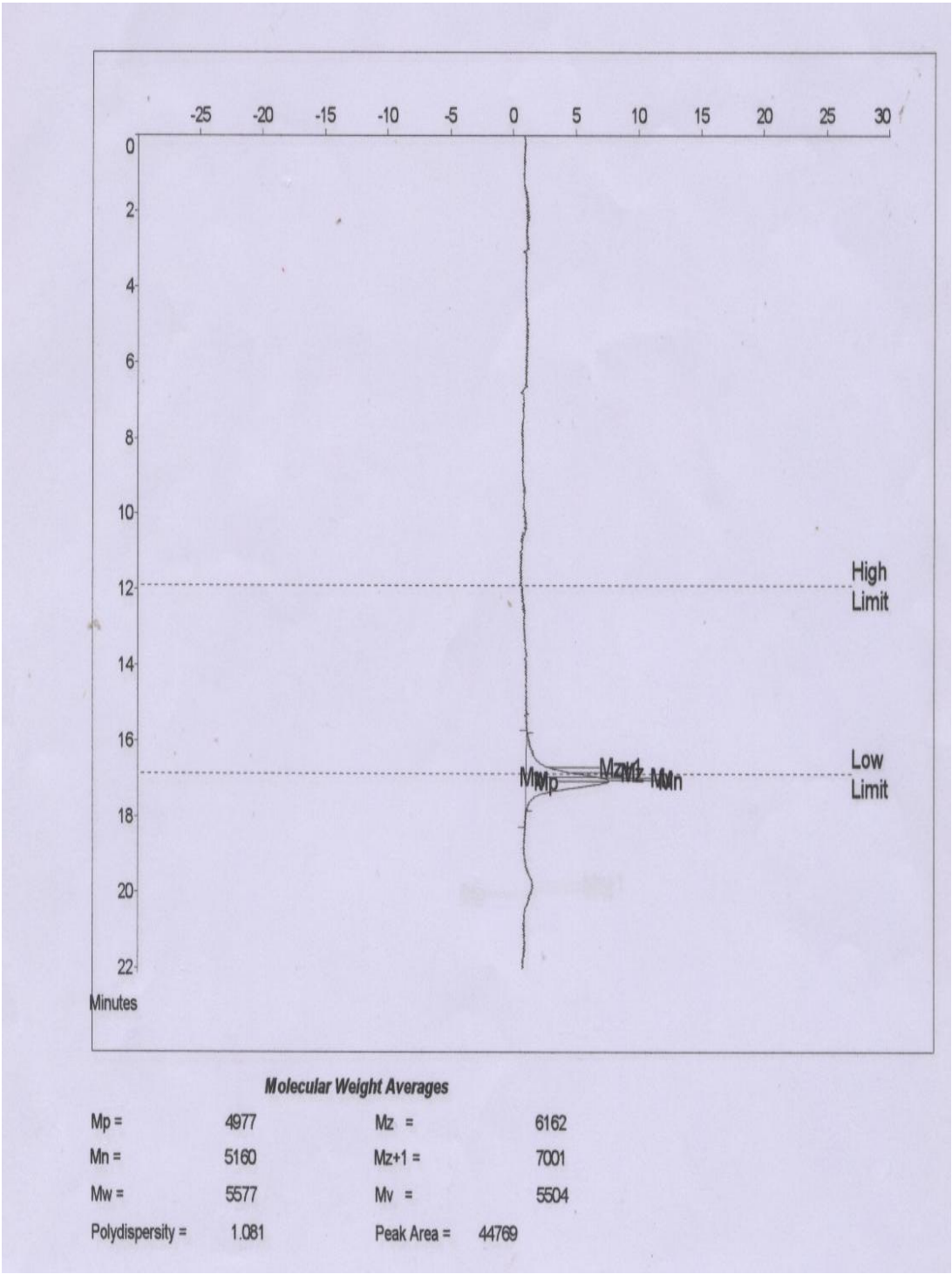
Table 35. Co-culture of *Stap. aureus* and *B. bifidum* used EPSs produced by *W. cibaria* A2 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Stap. aureus* (Log CFU/ml)		
	Stap. aureus + *B. bifidum*	*Stap. aureus* alone	*Stap. aureus* (No C-source)
0	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.06 ± 0.04
12	6.44 ± 0.06	6.51 ± 0.05	6.35 ± 0.07
24	8.94 ± 0.03	8.21 ± 0.11	6.93 ± 0.15
48	7.93 ± 0.04	7.39 ± 0.70	7.24 ± 0.07
72	8.15 ± 0.21	7.65 ± 0.07	7.29 ± 0.01

ตารางที่ 36 การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Sal. typhi* และ *B. bifidum* โดยใช้ EPss ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 เป็นแหล่งคาร์บอน

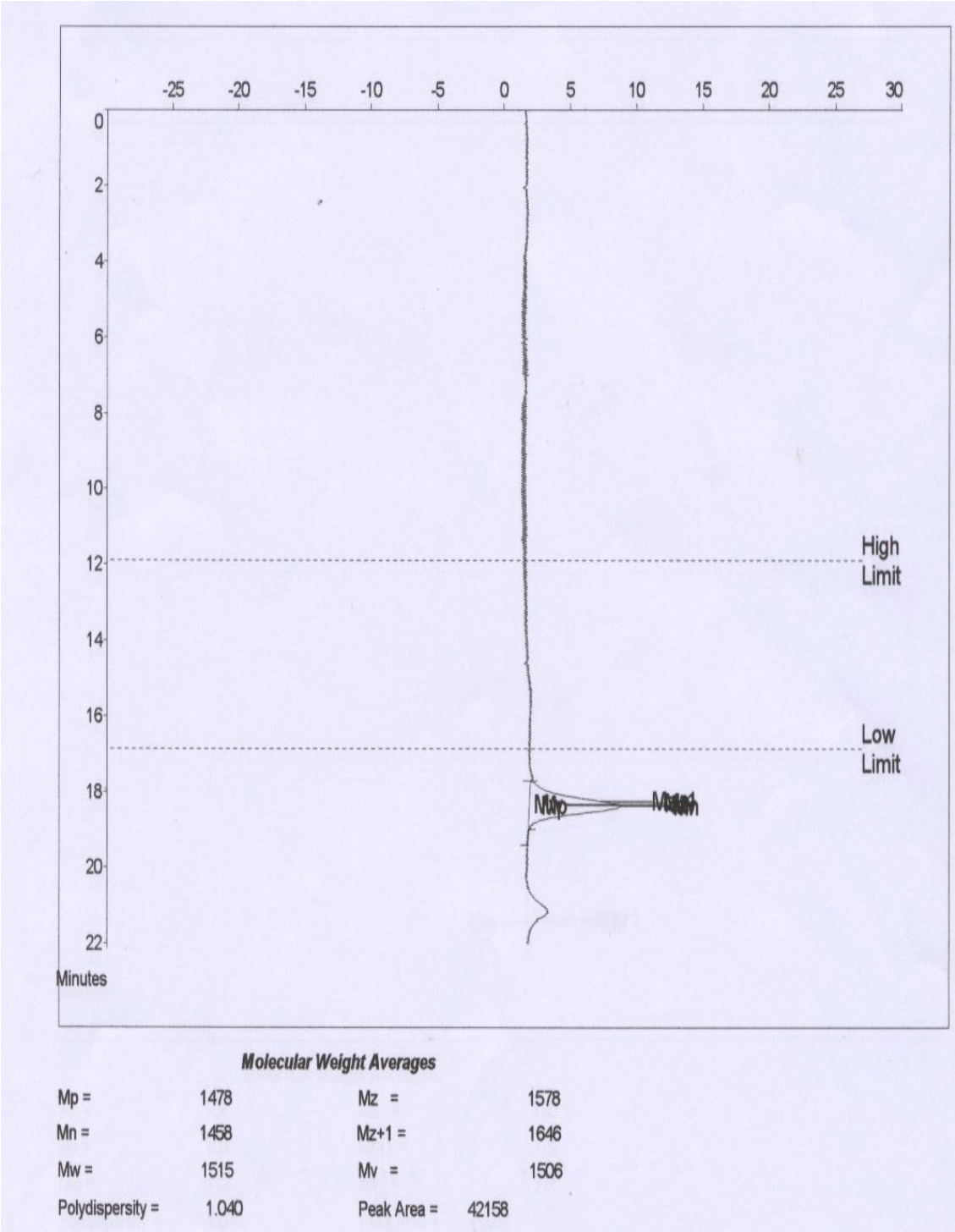
Table 36. Co-culture of *Sal. typhi* and *B. bifidum* used EPSs produced by *W. cibaria* A2 as carbon sources.

Time (h)	Growth of *Sal. typhi* (Log CFU/ml)		
	Sal. typhi + *B. bifidum*	*Sal. typhi* alone	*Sal. typhi* (No C-source)
0	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.34 ± 0.06
12	6.39 ± 0.12	6.30 ± 0.00	6.39 ± 0.12
24	9.15 ± 0.04	7.71 ± 0.32	6.51 ± 0.05
48	7.59 ± 0.16	7.69 ± 0.12	6.40 ± 0.02
72	8.07 ± 0.83	7.52 ± 0.11	5.90 ± 0.13



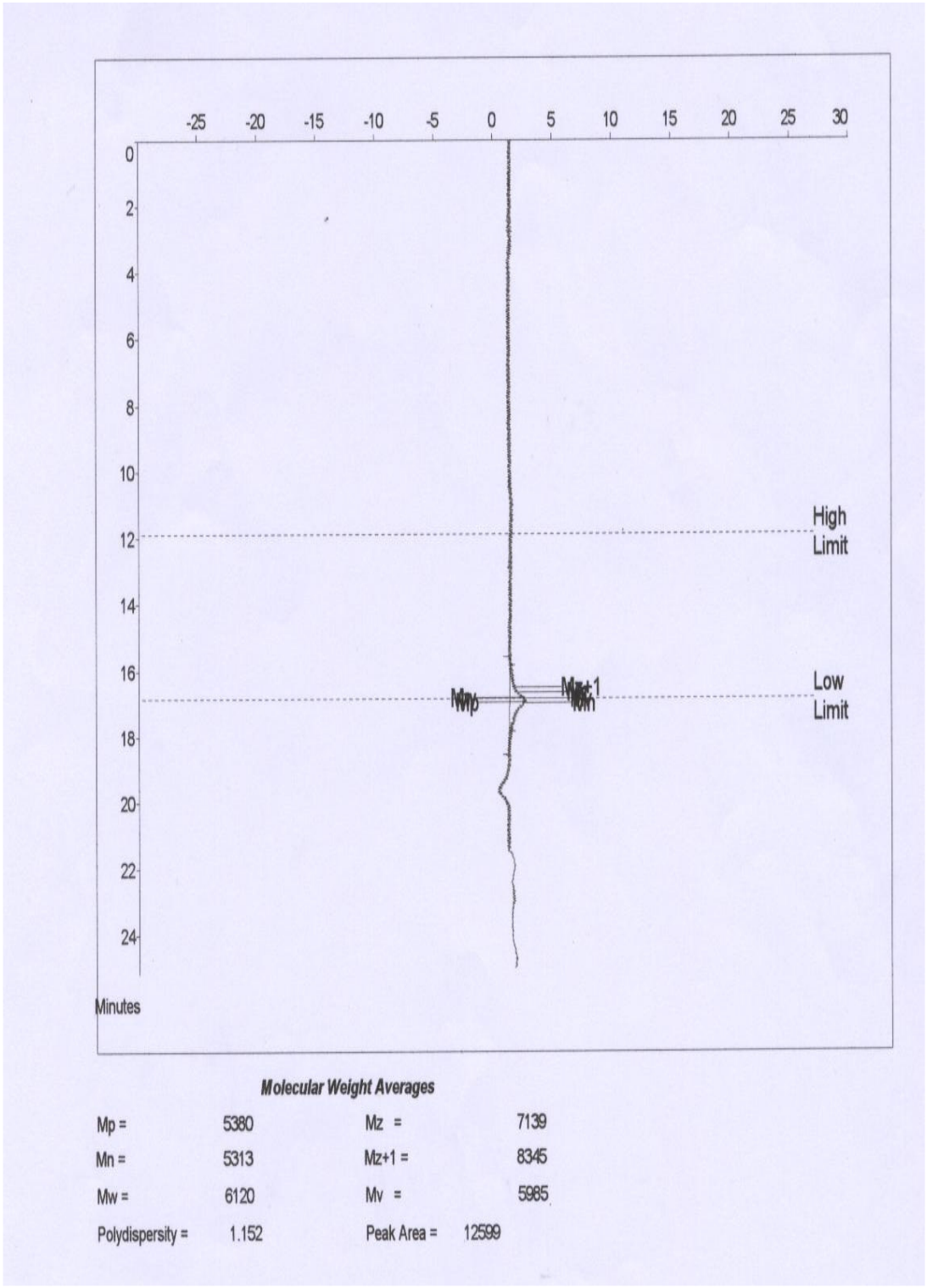
ภาพที่ 28 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ ของ EPSs ที่ผลิตโดย *P .pentosaceus* 5S4

Figure 28. GPC chromatogram of EPSs produced by *P. pentosaceus* 5S4.



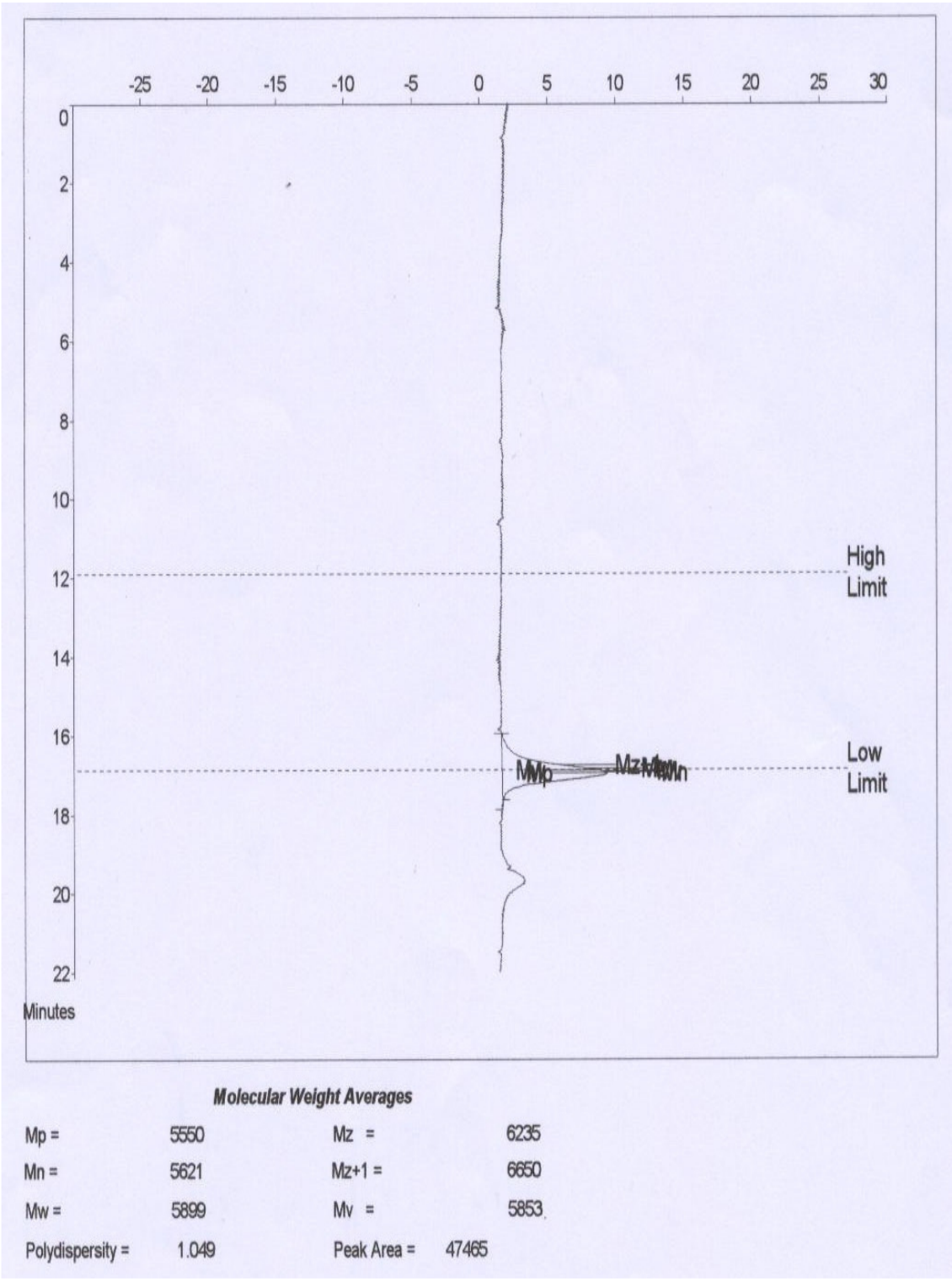
ภาพที่ 29 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ ของ EPSs ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3

Figure 29. GPC chromatogram of EPSs produced by *L. plantarum* A3



ภาพที่30 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ ของ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2

Figure 30. GPC chromatogram of EPSs produced by *W. cibaria* A2.



ภาพที่ 31 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ ของ EPSs ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9

Figure 31. GPC chromatogram of EPSs produced by *W. confusa* A9.

ตารางที่ 37 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ของ EPSs เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส

Table 37. Total and reducing sugar content in EPSs equivalence with glucose.

Sources of EPSs	Total sugar (mg/g)	Reducing sugar (mg/g)
W. cibaria A2	932.5	1.95
W. confusa A9	507	1.92
L. plantarum A3	570	1.97
P. pentosaceus 5S4	695	1.74