บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้าง เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (EPSs)

จากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิต EPSs ในอาหาร MRS แข็งที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และ แลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยการสังเกตโคโลนีที่เมือกเยื้อมและ การใช้สี RR ในการตรวจสอบพบว่า จากเครื่องในของปลา กุ้ง และตัวอย่างหอย 13 ชนิด สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 67 สายพันธุ์ สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs จากเครื่องในปลาสลิดหิน (Damsel fish) ได้มากที่สุดจำนวนคือ 14 สายพันธุ์โดยมีสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้ในปริมาณสูงคือ 9 กรัมต่อลิตรจำนวน 1 สายพันธุ์ ผลิตได้ในช่วง 3.1-3.6 กรัมต่อลิตรจำนวน 4 สายพันธุ์และผลิตได้ในช่วง 1.7-2.9 จำนวน 9 สายพันธุ์ ในขณะที่เมื่อแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs จากหอยแมลงภู่ (Green mussel) หอยแครง (Cockle) กุ้งขาว (White shrimp) และ ปลาโคก (Chacunda gizzard-shad) พบว่าได้แบคทีเรียแลกติกที่สร้าง EPSs น้อยที่สุดซึ่งมีจำนวนเท่ากันคือ 2 สายพันธุ์ จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 67 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิต EPSs ได้สูงที่สุดคือ 14.5 กรัมต่อลิตรเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จาก หอยแมลงภู่ ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้ในปริมาณน้อยที่สุดคือ 0.8 กรัมต่อลิตรเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยแครง (ตารางที่ 9)

ในการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการผลิต EPSs ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกันคือ จำนวน 35 สายพันธุ์ในสภาวะที่มีออกซิเจนและ 32 สายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยคิดเป็นร้อยละ 52.24 และ 47.76 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ทั้งนี้จากการศึกษามาพบว่าสภาวะที่มีความเหมาะสมในการสร้าง EPSs นั้นเป็นสภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณน้อย (Gamar-Nourani *et al*., 1998) ดังนั้นการที่แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงจึงผลิต EPSs ได้น้อย แต่จากวิธีการที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้าง EPSs นั้นได้ใช้สี RR มาใช้ในการตรวจสอบการสร้าง EPSs ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์ที่สร้าง EPSs ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ซึ่งมีปริมาณน้อยๆได้ จึงทำให้ตรวจสอบสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้ใกล้เคียงกัน ระหว่างสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

ตารางที่ 9 จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่สร้าง EPSs ที่แยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ

Table 9. Number of EPSs producing isolates obtained from marine animals.

Type of Samples	EPSs yield (g/l)	Obtained isolates	Total isolates
Perna viridis (Green mussel)	14.2-14.5	2	2
Arca granulosa (Cockle)	10.2	1	2
	2.1	1	
Rastrelliger brachysoma	4.4-4.9	3	5
(Short mackerel)	3.7	1	
	1.8	1	
Dascyllus aruanus (Damsel fish)	9	1	14
	3.1-3.6	4	
	1.7-2.9	9	
Batrachus grunniens (Toad Fish)	9.9	1	5
	1.2-3.5	4	
Parambassis siamensis (Pla Pan.)	9.9	1	5
	1.1-2.6	4	
Parupeneus cinnabarins (Red Mullet)	3.5-4.0	3	6
	1.9-2.4	3	
Penaeus vannamei (White shrimp)	3.9	1	2
	1.9	1	
Plotosus canius (Catfish)	3.1-3.8	5	8
	1.7-2.9	3	
Thenus spp.(Slipper Lobster)	3.5-3.6	2	4
	2.5-2.9	2	
Pla Tong-Taew	3.4-3.6	2	7
	2.3-1.6	5	
Anodontostoma chacunda	3.1-3.4	2	2
(Chacunda gizzard-shad)			

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Table 9. Cont.

Type of Samples	EPSs yield (g/l)	Obtained isolates	Total isolates
Otolithes spp.(Croaker)	2.1-3.4	2	5
	0.8-1.2	3	

ตารางที่ 10 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ

Table 10. Number of isolates obtained from aerobic and anaerobic condition.

Condition	Number of obtained isolates	Percentage (%)
Aerobic	35	52.24
Anaerobic	32	47.76

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs โดยการใช้อาหาร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันคือ น้ำตาล กลูโคส แลคโตส ฟรุคโตส และ ซูโครส พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิต EPSs ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้มากที่สุดคือ 27 สายพันธุ์ จากที่แยกได้ทั้งหมด 67 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 40.29 ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดในขณะที่ใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวนน้อยที่สุดคือ 12 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 17.91 ส่วนการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 14 สายพันธุ์เท่ากันโดยคิดเป็นร้อยละ 20.89 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Van Geel-Schutten และคณะ (1998) ที่พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการสร้าง EPSs ของแบคทีเรียแลกติกเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส แลคโตส มอลโตส และราฟิโนส นอกจากนี้จากการศึกษาโดย Smitinont และคณะ (1999) ซึ่งแยกแบคทีเรียที่สร้าง EPSs จากอาหารหมักพื้นบ้านโดยใช้อาหาร MRS ที่มีการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ และพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่สร้าง EPSs ได้จากอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น อย่างไรก็ตามในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้าง EPSs นั้นน้ำตาลที่ใช้ในการคัดเลือกนั้นไม่มีชนิดไหนที่ดีที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์นั้นๆ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างที่กระบวนการในการสร้าง EPSs ตั้งแต่การกระบวนการในการนำน้ำตาลเข้าสู่

เซลล์ตลอดจนกระบวนการสังเคราะห์หน่วยย่อยของน้ำตาลที่จะนำไปต่อเป็นสายพอลิเมอร์ของ EPSs (Chervaux *et al*., 2000 อ้างโดย Ruas-Madiedo and Reyes-Gavilan, 2005) เช่นเมื่อศึกษาการผลิต EPSs ของ *L. lactis* sp. *cremoris* NIZO B40 พบว่าผลิต EPSs ได้สูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Looijesteijn, 1999) ในขณะที่ *L. plantarum* EP56 สามารถผลิต EPSsได้สูงเมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Tallon *et al*., 2003) และ *S. thermophilus* จะผลิต EPSs ได้สูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Hassen, 2001) ขณะที่ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricu*s จะผลิต EPSs ในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยที่ไม่สามารถผลิต EPSs ในอาหารที่ใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Garcia-Garibay 1991) เป็นต้น

นอกจากชนิดของสัตว์ทะเล และชนิดน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต EPSs ที่แยกได้ยังขึ้นอยู่กับความไวของวิธีการตรวจสอบการผลิต EPSs ในคัดเลือกด้วยโดยได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต EPSs ในเชิงคุณภาพไปพร้อมกันกับการแยกเชื้อบนอาหารแข็ง MRS โดยใช้วิธีการตรวจสอบ 2 วิธีคือวิธีทางกายภาพที่ใช้วิธีการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เมือกเยิ้มหรือใช้ลูปมาแตะโคโลนีแล้วยกขึ้นเห็นเป็นเส้นใยยืด และวิธีทางเคมีซึ่งอาศัย การเติมสี ruthenium red (RR) เป็นสารในการตรวจสอบการสร้าง EPSs ในอาหาร MRS agar โดยพบว่าเมื่อใช้การสังเกตลักษณะเมือกเยิ้มของโคโลนีและโคโลนีที่นำลูปมาแตะแล้ว ยกขึ้นเห็นเป็นเส้นใยยืด (ภาพที่ 6) นั้นสามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถผลิต EPSs ในปริมาณที่สูงคือสามารถผลิตได้ในช่วง 10-14.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้สี RR ซึ่งเป็น polycationic dye ที่สามารเข้าจับกับสารประกอบที่มีประจุลบในกลุ่ม polysaccharides ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เช่นชั้น peptidoglycan ในแบคทีเรียแกรมบวกและชั้น lipopolysaccharides ของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นแบคทีเรียที่สร้าง EPSs สี RR จะไม่สามารถจับกับ polysaccharides ของผนังเซลล์ได้เนื่องจาก EPSs จะป้องกันไม่ให้สีเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จึงทำให้โคโลนีที่ผลิต EPSs ยังคงสีของโคโลนีเดิมของแบคทีเรียนั้นๆซึ่งอาจจะเป็นสีขาวหรือสีน้ำตาล ในทางตรงข้ามสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตEPSs โคโลนีที่พบบนอาหารแข็งจะเป็นสีแดงเนื่องจากสีสามารถเข้าไปจับกับผนังเซลล์ที่มีองค์ประกอบที่เป็นประจุลบได้ (Stingele *et al*., 1996) (ภาพที่ 7) จากการใช้สีในการคัดเลือกพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิต EPSs ได้ทั้งหมด 62 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 92.54 โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยวิธีนี้สามารถผลิต EPSs ได้ในช่วง 0.8-9 กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบการใช้ทั้งสองวิธีคือการสังเกตลักษณะเมือกเยิ้มของโคโลนีและการใช้สี RR ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs พบว่า การใช้สี RR สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs ได้มากกว่าการใช้การสังเกตลักษณะเมือกเยิ้มเนื่องจากการใช้สีในการคัดเลือกนั้น

สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ในปริมาณน้อยๆได้ซึ่งสังเกตได้จากสายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สีจะผลิต EPSs ได้ในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้วิธีการสังเกตลักษณะเมือกเยิ้มของโคโลนีซึ่งผลิต EPSs ได้ในปริมาณที่สูงกว่า (ตารางที่ 12) ดังนั้นการใช้อาหารที่มีการเติม RR จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต EPSs อีกทั้งการแยกและคัดเลือกสามารถทำได้ไปพร้อมๆกันโดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อออกมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนแล้วจึงมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อวัดปริมาณการผลิต EPSs ทำให้การแยกและคัดเลือกทำได้อย่างรวดเร็ว ง่าย และประหยัด ได้มีนักวิจัยพยายามศึกษาวิธีอื่นๆเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบการผลิต EPSs ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเช่น Welman และคณะ (2003) ที่ใช้วิธีการสังเกตคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต EPSs โดยการสังเกตโคโลนีที่เมือกเยิ้ม ของ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ซึ่งพบว่ามีปัญหาในการตรวจสอบสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้ในปริมาณน้อย จึงได้เสนอแนะให้มีการใช้การตรวจสอบปริมาณการสร้าง ATP ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง sugar nucleotide ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการที่จะนำไปสร้าง EPSs พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าการสังเกตลักษณะเยิ้มของโคโลนี แต่อย่างไรก็ตามก็ยังเป็นวิธีที่ยุ่งยากกว่าการใช้สีในการตรวจสอบ

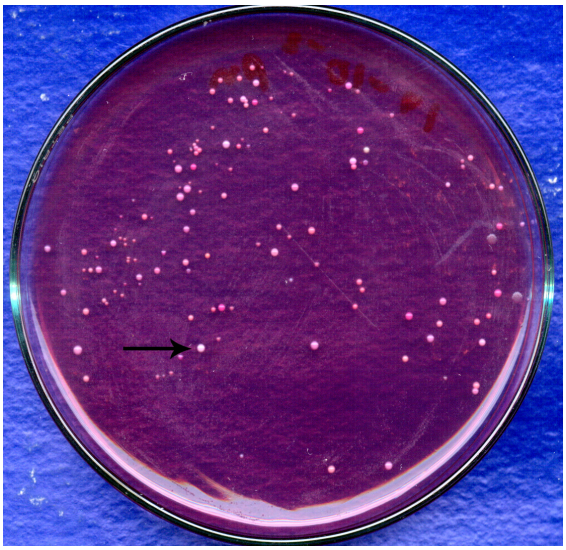
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต EPSs ที่แยกได้จากการคัดเลือก โดยใช้การสังเกตลักษณะทางกายภาพ กับการใช้อาหาร MRS ที่เติมสี ruthenium red

Table 11. Comparison of EPSs producing lactic acid bacteria obtained by slimy appearance and ruthenium red detection in MRS agar.

Methods used for screening	Isolates obtained		EPSs yield (g/L)	Number of isolates (%)			
	No. of isolates	Percentage %		Sucrose	Fructose	Lactose	Glucose
Ruthenium Red (RR) detection	62	92.54	0.8-9	22(32.83)	14(20.89)	12(17.91)	14(20.89)
Slimy appearance detection	5	7.46	10-14.5	5(7.46)	-	-	-

ภาพที่ 6 ลักษณะเมือกของโคโลนีที่มีการสร้าง EPSs บนอาหาร MRS

Figure 6. Slimy appearance of lactic acid bacteria on MRS agar.



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สร้าง EPSs บนอาหาร MRS ที่เติม RR โดยที่โคโลนีสีขาว (ลูกศรชี้) เป็นโคโลนีที่มีการสร้าง EPSs ในขณะที่โคโลนีสีแดงหรือชมพูเป็นโคโลนีที่ไม่สร้าง EPSs

Figure 7. Colony appearance of LAB on RR-MRS, EPSs producing strains appear as white colony, and non EPSs producing strains appear as red or pink colony.

จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 67 สายพันธุ์ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้สูงมาจำนวน 4 สายพันธุ์โดยทำการคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้ในปริมาณสูงจากทั้งหมด 67 สายพันธุ์ซึ่งเป็นตัวแทนของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกจากตัวอย่างต่างชนิดกันซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต่างสายพันธุ์กันได้แก่ A2, A3, A9 และ 5S4 ซึ่งผลิต EPSs ได้ 14.0, 4.9, 7.6 และ 5.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่12)โดยทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จาก หอยแมลงภู่ ปลาสลิดหิน ปลาแป้น และปลาทู ตามลำดับในอาหาร MRS ที่เติมน้ำตาลซูโครสในสภาวะไม่มีอากาศอากาศ เมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสของ16S rDNA โดยใช้โปรแกรม BLAST เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nim.gov) เมื่อวันที่ 17 มกราคม พ.ศ. 2550 พบว่า ลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ A2, A9, A3 และ 5S4 มีความเหมือนกับ *Weissella cibaria* Uga49-1 (ภาพที่ 8) *Weissella confusa* Inje LMS-338 (ภาพที่ 9) *Lactobacillus plantarum* JCM 8348 (ภาพที่ 10) และ *Pediococcus pentosaceus* SL4 (ภาพที่ 11) ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และปริมาณ EPSs ที่ผลิตได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

Table 12. Identification of selected isolates and the yield of EPSs production in MRS broth contained sucrose as a carbon source.

Bacteria	**% Identity**	**EPSs production (g/l)**
Weissella cibaria A2	99 (1430/1433)	14.0
Lactobacillus plantarum A3	96 (521/541)	4.9
Weissella confusa A9	100 (1387/1387)	7.6
Pediococcus pentosaceus 5S4	98 (545/551)	5.0

จากผลการจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs พบว่าเป็นครั้งแรกที่มีการคัดแยกแบคทีเรีย ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการผลิต EPSs จากทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเกี่ยวกับความสามารถในการผลิต EPSs มาแล้วแต่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จาก Sourdough

```
 Score = 2811 bits (1418),  Expect = 0.0
 Identities = 1430/1433 (99%), Gaps = 1/1433 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  3     TTAGAGTTTGGATTCNTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC  62
             |||||||||| || | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2     TTAGAGTTTG-ATCCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC  60

Query  63    GAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCA  122
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    GAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCA  120

Query  123   AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATT  182
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATT  180

Query  183   TGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATG  242
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   TGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATG  240

Query  243   GTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCT  302
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   GTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCT  300

Query  303   CACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGAC  362
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   CACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGAC  360

Query  363   ACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTG  422
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   ACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTG  420

Query  423   ATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGA  482
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   ATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGA  480

Query  483   AGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCT  542
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   AGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCT  540

Query  543   AAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGG  602
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   AAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGG  600

Query  603   CGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGG  662
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   CGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGG  660

Query  663   AATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAG  722
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   AATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAG  720

Query  723   CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTA  782
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTA  780

Query  783   ACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  842
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   ACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  840

Query  843   ACCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACG  902
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   ACCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACG  900
```

ภาพที่. 8 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16s rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ A2 กับ *Weissella cibaria* Uga49-1

Figure 8. Comparison of 16s rDNA nucleotides sequence of strain A2 with *Weissell cibaria* Uga49-1.

```
Query  903   CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  962
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  960

Query  963   GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  1022
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  1020

Query  1023  GTCTTGACATCCCTTGACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAG  1082
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  GTCTTGACATCCCTTGACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAG  1080

Query  1083  GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  1142
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1081  GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  1140

Query  1143  GCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGAC  1202
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1141  GCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGAC  1200

Query  1203  AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAC  1262
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1201  AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAC  1260

Query  1263  ACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAA  1322
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1261  ACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAA  1320

Query  1323  AGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGT  1382
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1321  AGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGT  1380

Query  1383  AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG  1435
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1381  AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG  1433
```

ภาพที่ 8 (ต่อ)

Figure 8. (Cont.)

```
 Score = 2750 bits (1387),  Expect = 0.0
 Identities = 1387/1387 (100%), Gaps = 0/1387 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTGGTTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13    TGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTGGTTC  72

Query  61    AACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73    AACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGG  132

Query  121   TGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133   TGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAA  192

Query  181   TACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTGTTATTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193   TACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTGTTATTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAA  252

Query  241   GAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGATGATG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253   GAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGATGATG  312

Query  301   CATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313   CATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTA  372

Query  361   CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373   CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCG  432

Query  421   TGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433   TGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAG  492

Query  481   TAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493   TAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAG  552

Query  541   CCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553   CCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  612

Query  601   ACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613   ACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACT  672

Query  661   GGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  673   GGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  732
```

ภาพที่ 9 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16s rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ A9 กับ *Weissella confusa* Inje LMS-338

Figure 9. Comparison of 16s rDNA nucleotides sequence of strain A9 with *Weissell confusa* Inje LMS-338.

```
Query  721   TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  733   TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTC  792

Query  781   GAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  793   GAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGT  852

Query  841   GCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  853   GCTAGGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC  912

Query  901   TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  913   TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT  972

Query  961   GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTG  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  973   GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTG  1032

Query  1021  ACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1033  ACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  1092

Query  1081  GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTA  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1093  GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTA  1152

Query  1141  GTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1153  GTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG  1212

Query  1201  GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1213  GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG  1272

Query  1261  TATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCG  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1273  TATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCG  1332

Query  1321  GATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAC  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1333  GATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAC  1392

Query  1381  GCCGCGG  1387
             |||||||
Sbjct  1393  GCCGCGG  1399
```

ภาพที่ 9 (ต่อ)

Figure 9. (Cont.)

```
Score =  878 bits (443),  Expect = 0.0
Identities = 521/541 (96%), Gaps = 6/541 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query  1    GATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  24   GATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTG  83

Query  61   GGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  84   GGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA  143

Query  121  CTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  144  CTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG  203

Query  181  CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  204  CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCT  263

Query  241  GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  264  GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA  323

Query  301  GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCACCGCCGCGTGAGTGAAGAAG  360
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  324  GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  383

Query  361  GGTTTCGGCTCGT-AAACTCTGTTGTTAAAGAA-AACATATCTGAAAGTAACTGTTCAGG  418
            |||||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  384  GGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGG  443

Query  419  TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCC-CCGNTTACTACNTGCCANCA-CCCCGGTAATAC  476
            |||||||||||||||||||||||||| | | | ||||| ||||| || || |||||||||
Sbjct  444  TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  503

Query  477  NTAGGTGGCAAGCGTTTTCCGGATTT-TTGGGNGTNAAACCGAGCCCAGGCGNTTTTTTA  535
             ||||||||||||||| |||||||| ||||| || ||| ||||| |||||| |||||||
Sbjct  504  GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT-AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTA  562

Query  536  A  536
            |
Sbjct  563  A  563
```

ภาพที่ 10 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16s rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 กับ *Lactobacillus plantarum* CM 8348

Figure 10. Comparison of 16s rDNA nucleotides sequence of strain A3 with *Lactobacillus plantarum* CM 8348.

```
 Score = 1025 bits (517),  Expect = 0.0
 Identities = 545/551 (98%), Gaps = 3/551 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  3    ATTGATTATGACGTACTTGT-CTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGT  61
            |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   ATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGT  132

Query  62   GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT  121
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT  192

Query  122  ACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCT  181
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCT  252

Query  182  GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGCAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATAC  241
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGCAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATAC  312

Query  242  GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC  372

Query  302  GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT  361
            |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCTCAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT  432

Query  362  GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGT  421
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGT  492

Query  422  AACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  481
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  AACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  552

Query  482  CGCGGGTAATACGTAGGTGGCANGCGTTATCCGGATTTNTTGGGCGT-AAGCGAGCGCAG  540
            ||| |||||||||||||||| |||||||||||||| |||||||| ||||||||||||
Sbjct  553  CGC-GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  611

Query  541  GCGGTCTTTTA  551
            ||||||||||| 
Sbjct  612  GCGGTCTTTTA  622
```

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16s rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 5S4 กับ *Pediococcus pentosaceus* SL4

Figure 11. Comparison of 16s rDNA nucleotides sequence of strain 5S4 with *Pediococcus pentosaceus* SL4.

จากผลการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งมีความสามารถในการผลิต EPSs พบว่ามีรายงานว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *W. cibaria*, *L .plantarum* และ *P. pentosaceus* จาก Sourdough ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต EPSs ชนิด fructan และ glucan ในอาหาร MRS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น โดย EPSs ที่ผลิตได้นั้นมีน้ำหนักโมเลกุล 10^4 ดาลตัน และผลิต EPSs ได้ในช่วง 5.54-7.88 กรัมต่อลิตรสำหรับ *W. cibaria* ซึ่งผลิตได้น้อยกว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในการทดลองครั้งนี้ในขณะที่ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* สามารถผลิต EPSs ได้สูงกว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยผลิตได้ 7.39 และ6.85 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (Cagno *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการผลิต EPSs โดย *L. plantarum* ว่าสามารถผลิต EPSs ชนิด Heteropolysacchrides ได้ (Tallon *et al*., 2003) นอกจากนี้ Tieking และคณะ(2003) ได้รายงานว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Weissella confusa* จาก Sourdough โดยเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต EPSs ชนิด fructan ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

3.2 คุณสมบัติทางเคมีของ EPSs

3.2.1 น้ำหนักโมเลกุล

เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ EPSs ที่ผลิตโดยสายพันธุ์โดยวิธี Gel-Permeation Chromatography (GPC) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่มากที่สุดคือ 6120 ดาลตันในขณะที่ EPSs ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 มีน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยที่สุดคือ 1515 ดาลตัน ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยน้ำหนักโมเลกุลที่ได้นั้นเป็นน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ EPSs ซึ่งประกอบไปด้วยหลายส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันและเป็นส่วนที่ละลายได้เท่านั้นเมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่ได้นั้นมีค่าน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกมีมีค่าอยู่ในช่วง 10^4-10^6 ดาลตัน (Cerning, 1990) ทั้งนี้เนื่อง EPSs ที่ได้เป็นพอลิเมอร์ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำนอกจากนี้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลนั้นสามารถทำได้กับ EPSs ที่ละลายได้เท่านั้น

3.2.2 ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบใน EPSs ที่ผ่านการย่อยด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) พบว่า EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2, *L. plantarum* A3, *W.confusa* A9, และ*P. pentosaceus* 5S4 มีค่าRetention factor (R_f) เท่ากับ 0.50, 0.50, 0.48 และ 0.48 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อทดสอบกับน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และ ไซโลส มีค่า R_f เท่ากับ 0.48, 0.4 และ0.67 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า EPSs มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 12)

ตารางที่13 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก

Table 13. Average molecular weight of EPSs produced by lactic acid bacteria.

EPSs sources	Average molecular weight (Da)
Weissella cibaria A2	6120
Weissella confusa A9	5899
Lactobacillus plantarum A3	1515
Pediococcus pentosaceus 5S4	5577

ภาพที่ 12. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 (A), *W. confusa* A9 (B), *L. plantarum* A3 (C), *P. pentosaceus* 5S4 (D) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส (G), กาแลคโตส (Ga) และ ไซโลส (Xy) ในการเปรียบเทียบ

Figure 12. TLC identification of hydrolysis products obtained from EPSs produced by *W. cibaria* A2 (A), *W. confusa* A9 (B), *L. plantarum* A3 (C), *P. pentosaceus* 5S4 (D) used glucose (G), galactose (Ga), and Xylose (Xy) as reference sugars.

3.3 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์

เมื่อนำ EPSs ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 น้ำหนักต่อปริมาตร มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, *Stap. aureus*, *A. fumigatus* และ *C. albicans* พบว่าไม่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 14) โดยก่อนหน้านี้ไม่พบการรายงานเกี่ยวกับกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของ EPSs จากแบคทีเรียแลกติก เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียโดยตรง แต่จะมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของ EPSs ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายในการต้านแบคทีเรียก่อโรคเมื่อมีการติดเชื้อเกิดขึ้น (Law *et. al*., 2001)

ตารางที่ 14 ค่า Minimal inhibition concentration (MIC) ของ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 และ *P. pentosaceus* 5S4 กับจุลินทรีย์ก่อโรค

Table 14. Minimal inhibition concentration (MIC) values (mg/ml) of EPSs produced by *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 and *P. pentosaceus* 5S4 against pathogenic microorganisms.

Pathogenic microorganisms	EPSs producers			
	W. cibaria A2	*W. confusa* A9	*L. plantarum* A3	*P.pentosaceus* 5S4
Stap. aureus	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
Salmonella sp.	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
E.coli O157 : H7 DMST 12743	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
C. albicans	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
A. fumigatus TISTR 3180	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0

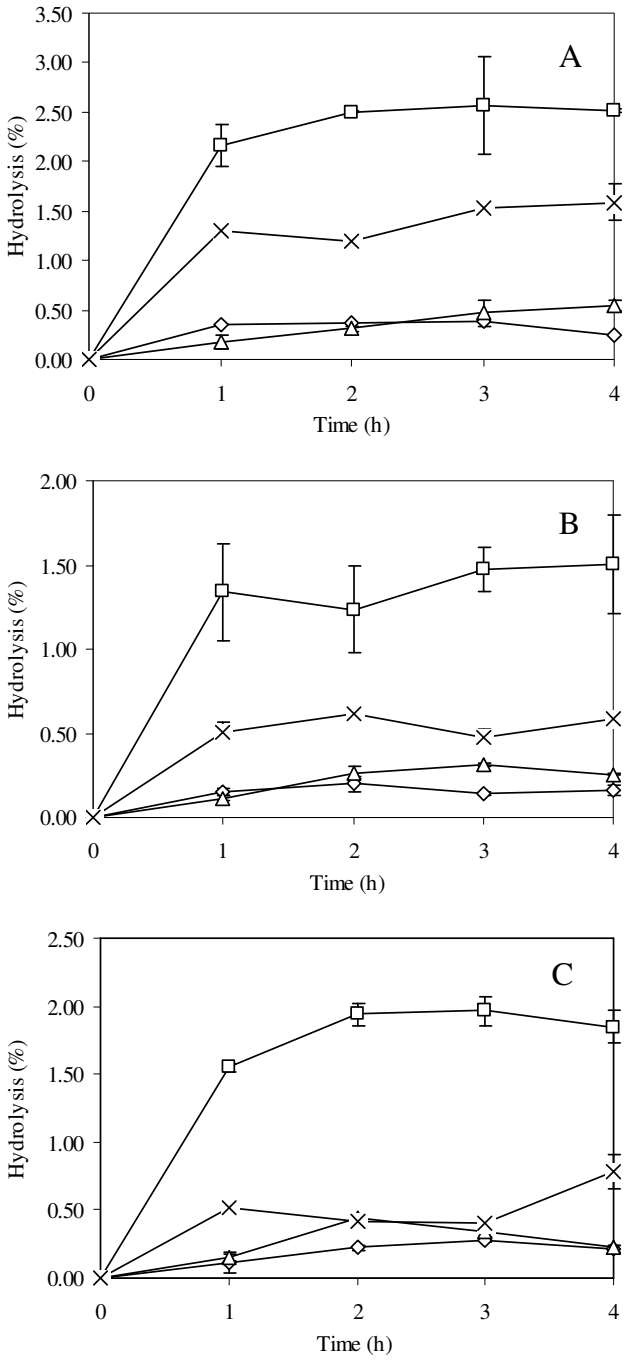
3.4 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของ EPSs

3.4.1 การทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรด

เมื่อทดสอบการทนต่อการย่อยของ EPSs ในสภาวะความเป็นกรดที่ระดับพีเอชต่างๆคือ 1, 2 และ 3 พบว่า ที่พีเอช 1 EPSs ที่ผลิตจาก *W. confusa* A9 ถูกย่อยสลายสูงสุดโดยเมื่อครบเวลา 4 ชั่วโมง คือ ถูกย่อยร้อยละ 2.5 ของปริมาณ EPSs เริ่มต้น นอกจากนี้ยังเป็น EPSs ที่ถูกย่อยสูงสุดที่พีเอช 2 และ 3

เมื่อเปรียบเทียบกับ EPSs ชนิดอื่น ซึ่งแนวโน้มในการย่อยนั้นเพิ่มขึ้นใน 1 ชั่วโมงแรก และคงที่เมื่อย่อยเป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมงในขณะที่ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 ทนต่อสภาวะความเป็นกรดสูงได้ดีที่สุดโดยถูกย่อยที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมงเท่ากับร้อยละ 0.351±0.70 ส่วน EPSs ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4 และ *L. plantarum* A3 นั้นถูกย่อยร้อยละ 0.547± 0.50 และ 1.591±0.179 ตามลำดับที่เวลา 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 13) ดังนั้น EPSs จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถทนต่อการย่อยโดยกรดที่พีเอช 1 ได้สูงโดยมีส่วนที่ไม่ถูกย่อยถึงร้อยละ 99.65, 97.48, 99.45 และ 98.41 สำหรับ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 และ *P. pentosaceus* 5S4 ตามลำดับ

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดสูงโดยการใช้ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (HCl buffer) ระดับพีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงพบว่า EPSs ทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดสอบมีความสามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีมากและมีบางส่วนเท่านั้นที่ถูกย่อย เมื่อพิจารณาร้อยละของ EPSs ที่ถูกย่อยเปรียบเทียบกับ EPSs ชนิดอื่นที่มีการทดสอบมาแล้วพบว่าสามารถทนการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดสูงได้เช่นเดียวกันกับ EPSs ที่ถูกผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. sanfranciscensis* TMW1.392 ซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดสูงในกระเพาะที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงพบว่ามีเพียงร้อยละ 3 เท่านั้นที่ถูกย่อย (Korakli, 2002) เช่นเดียวกันกับ EPSs ที่ผลิตจาก *L. sanfranciscensis* LTH 2590 ที่มีความสามารถในการทนต่อการย่อยในกระเพาะอาหารเช่นกัน (Crocianic *et al.,* 1994 อ้างโดย Korakli *et al.,* 2002) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาความสามารถในการทนต่อการย่อยของ levan ที่ได้จากการสังเคราะห์จากน้ำตาลซูโครสโดยใช้ น้ำย่อยจากกระเพาะ (gastric juice) พบว่าสารดังกล่าวจะถูกย่อยไปบางส่วนเท่านั้น โดยที่ผลจากการถูกย่อยโดยกรดทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ levan ลดลง (Yamamoto *et al*., 1999) และจากการทดสอบกับโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) และอินนูลิน (inulin) พบว่าถูกย่อยไปบางส่วนเท่านั้นซึ่งมีส่วนที่เหลือไปยังลำไส้ใหญ่ถึงร้อยละ 85-89 และเมื่อเปรียบเทียบการทนต่อการย่อยในสภาวะเป็นกรดสูงกับพรีไบโอติกชนิดอื่นที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่า EPSs ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความสามารถทนได้ดีกว่าพรีไบโอติกดังกล่าวซึ่งแสดงให้เห็นว่า EPSs ที่ได้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นพรีไบโอติกที่ดี



ภาพที่ 13 การย่อยของ EPSs ที่ผลิตโดย (Δ) *W. confusa* A9, (□) *L. plantarum* A3 (◊), *W. cibaria* A2 และ (×) *P. pentosaceus* 5S4 ด้วยบัพเฟอร์ของกรดเกลือ ที่พีเอช 1 (A), 2 (B) และ 3 (C)

Figure 13. Hydrolysis of EPSs produced by (Δ) *W. confusa* A9, (□) *L. plantarum* A3, (◊) *W. cibaria* A2 and (×) *P. pentosaceus* 5S4 in HCl buffer pH of 1 (A), 2 (B) และ 3 (C).

3.4.2 การทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase

นอกจากคุณสมบัติในการทนต่อการย่อยจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารแล้ว พอลิเมอร์ที่จัดได้ว่ามีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกยังต้องทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ α-amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 ในลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงทดสอบการทนต่อการย่อยของ EPSs ด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase โดยการนำ EPSs ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเกลือ ที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า EPSs ที่ผลิตจาก *W. cibaria* A2, *L. plantarun* A3 และ *P. pentosaceus* 5S4 มีร้อยละที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์เท่ากับ 0.170 0.144 และ 0.027 ตามลำดับในขณะที่ EPSs ที่ผลิตจาก *W. confusa* A9 ไม่ถูกย่อยเลยโดย α-amylase (ตารางที่ 15) เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Yamamoto และคณะ (1999) ที่ทดสอบใช้น้ำย่อยจากตับอ่อนซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์ α-amylase มาย่อย levan แล้วพบว่าไม่มีการย่อยเกิดขึ้นเนื่องจากพันธะที่เชื่อมภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์ดังกล่าวเป็น β-2,6 ซึ่งไม่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าว และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อการย่อยโดยกรดและเอนไซม์ของ EPSs กับสารสกัดจากพืชซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารของคนขององค์ประกอบในส่วนที่ไม่ใช่แป้ง (non starch polysaccharides,NSP) ของขนมปังที่ทำมาจากข้าวโพด (White bread cornflakes) พบว่าไม่ถูกย่อยในการทดสอบการทนต่อกรดและเอนไซม์ในในลำไส้เล็กของคนขณะที่ ข้าวโอต (Oats) กล้วย และมันฝรั่งมีการย่อยสลายร้อยละ 5.2, 2.9 และ 13.1 ตามลำดับ จึงเห็นได้ว่า EPSs สามารถทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพรีไบโอติกที่จากพืชที่ได้มีการทดสอบมาแล้ว (Englyst and Cumming, 1985 อ้างโดย Cumming and Englyst, 1987) เช่นเดียวกันกับ oligosaccharides ซึ่งเป็นพรีไบโอติกที่ได้จากนมแม่ที่ได้นำไปทำเป็นพรีไบโอติกเนื่องจากได้ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการทนต่อการย่อยได้ดีทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (Gnoth, 2000)

จากการทดสอบคุณสมบัติของพรีไบโอติกในด้านความสามารถในการทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนซึ่งได้แก่การทนต่อการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กซึ่งพบว่า EPSs ทั้งหมดสามารถทนต่อการย่อยได้ดีมากโดยมีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ถูกย่อย ทั้งนี้เนื่องจาก EPSs ที่ใช้ในการทดสอบมีความสามารถในการทนต่อการย่อยโดยกรดซึ่งเป็นการย่อยแบบสุ่ม ทั้งนี้เนื่องจากความแข็งแรงของพันธะภายในพอลิเมอร์ แต่อย่างไรก็ตามในการทดสอบการย่อยในลำไส้เล็กนั้นมีการทดสอบกับเอนไซม์ human pancreatic α-amylase เท่านั้นซึ่งในความเป็นจริงยังมีเอนไซม์ α-amylase ซึ่งพบในน้ำลายซึ่งมีความจำเพาะเช่นเดียวกันกับเอนไซม์นำลำไส้เล็กซึ่งอยู่ในปากแต่การย่อยดังกล่าวเกิดขึ้นได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยของ α-amylase ที่อยู่ในลำไส้

เล็กนอกจากนี้ ในลำไส้เล็กนั้นยังมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโพลิแซคคาไรด์ได้เช่น เช่น glucoamylase, maltase, lactase และ sucrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับ α-1,6 และ α-1,4 (Smith and Morton, 2001 อ้างโดย Wichienchot, 2005) ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะย่อย EPSs เนื่องจาก EPSs ทั้ง 4 ชนิดเป็นชนิด homopolysaccharides ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะต่อกันด้วยมีพันธะ α-1,6 ทำให้ ในความเป็นจริงอาจถูกย่อยมากกว่าที่คาดไว้แต่อย่างไรก็ตาม แนวโน้มในการที่มีปริมาณของ EPSs ที่จะเหลือไปยังลำไส้ใหญ่ที่สูงอยู่จึงน่าสนใจในการที่จะนำ EPSs ดังกล่าวไปใช้เป็นพรีไบโอติกต่อไป

ตารางที่ 15 ร้อยละของการย่อย EPSs โดยเอนไซม์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

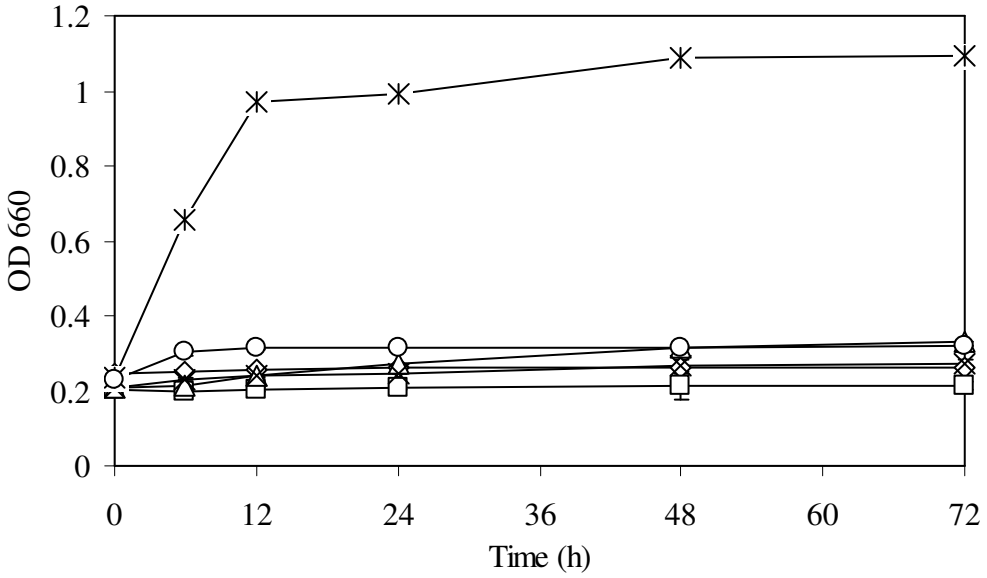
Table 15. Percentage of enzymatic hydrolysis of EPSs for 6 h.

Sources of EPSs	Enzymatic hydrolysis (%)
W. cibaria A2	0.170[a]
L. plantarum A3	0.144[a]
W. confusa A9	0.000[c]
P. pentosaceus 5S4	0.027[b]

3.4.3 ผลของการใช้ EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

นอกจากคุณสมบัติการทนต่อการย่อยโดยกรดและเอนไซม์ในทางเดินอาหารส่วนบนแล้ว พรีไบโอติกจะต้องสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ได้ด้วยโดยได้ทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ต่อแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plamtarum* เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยสามารถวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ1.097 ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยที่แนวโน้มในการเจริญจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลา 12 ชั่วโมงแรกแล้วอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ EPSs ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเปลี่ยนแปลงของความขุ่นน้อยมาก และไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมแหล่งคาร์บอนจึงสรุป

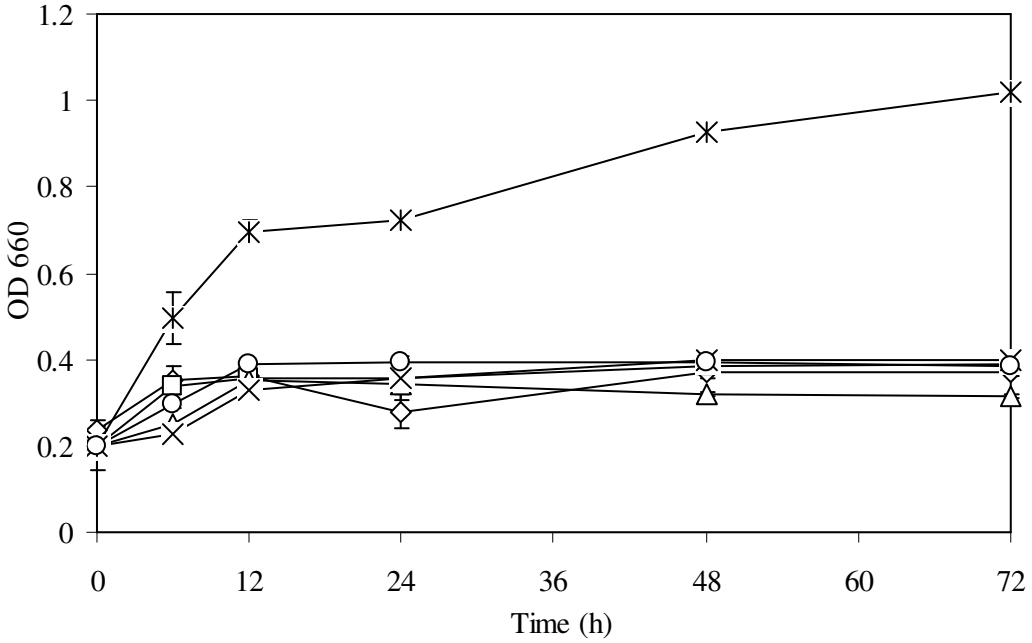
ได้ว่า *L. plantarum* ไม่สามารถใช้ EPSs ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ (ภาพที่14)



ภาพที่ 14 การเจริญของ *L. plantarum* ในอาหาร minimal medium ที่มีการเติม EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3 (△), *P. pentosaceus* 5S4 (×) Glucose (∗) และ ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (○) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

Figure 14. Growth of *L. plantarum* in minimal medium contained EPSs produced by *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3 (△), *P. pentosaceus* 5S4 (×), Glucose (∗) and without carbon source (○) at 37°C for 72 h.

เมื่อทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* ของ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์โดยการเติมเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลในอาหาร minimal medium เปรียบเทียบการเจริญเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *L. acidophilus* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยที่แนวโน้มในการเจริญจะค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเลี้ยง ในขณะที่เมื่อใช้ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนการเจริญที่วัดได้ไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า *L. acidophilus* ไม่สามารถใช้ EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ (ภาพที่ 15)

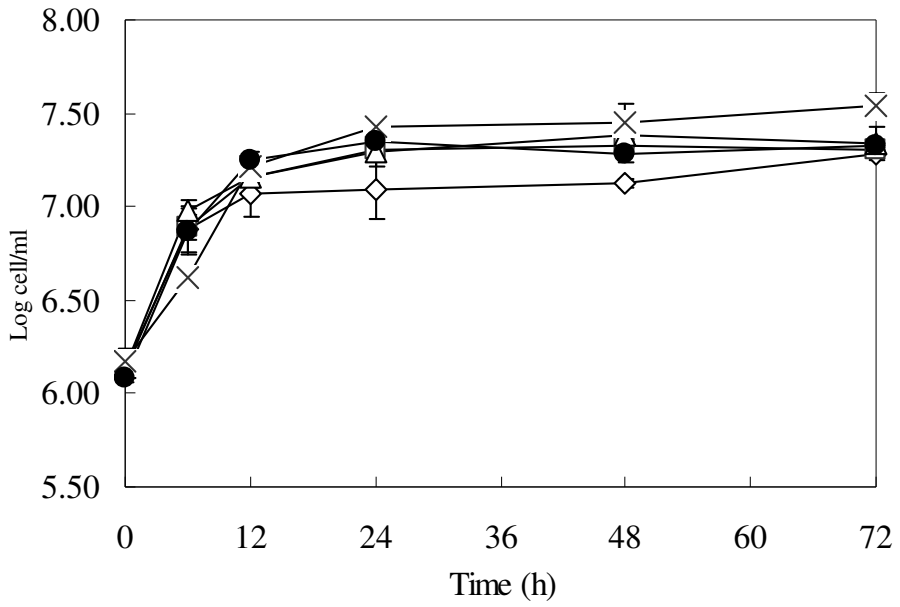


ภาพที่15 การเจริญของ *L. acidophilus* ในอาหาร minimal medium ที่มีการเติม EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3 (Δ), *P. pentosaceus* 5S4 (∗), Glucose (×) และ ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (○) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

Figure 15. Growth of *L. acidophilus* in minimal medium contained EPSs produced by *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3 (Δ), *P. pentosaceus* 5S4 (∗), Glucose (×) and without carbon source (○) at 37 ^{o}C for 72 h.

เมื่อศึกษาการใช้ EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนของ *B. bifidum* พบว่า *B. bifidum*สามารถเจริญได้ จึงมีการรายงานรูปแบบของการเจริญให้ชัดเจนขึ้นโดยการรายงานในรูปของจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยพบว่า การเจริญของ *B. bifidum* จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการเจริญและมีแนวโน้มของการเจริญค่อนข้างคงที่ไปจนครบ 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 72 ชั่วโมงจำนวนเซลล์ของ *B. bifidum* จะอยู่ในช่วง 7.28-7.54 Log cellต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าเมื่อใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 เป็นแหล่งคาร์บอนจะพบการเจริญสูงสุดคือ 7.54 Log cellต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับการใช้ EPSs ชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนในขณะที่เมื่อใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 และ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนพบการเจริญที่เวลา 72 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.28, 7.34, 7.30 และ 7.32 Log cellต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

จากการที่มีการวัดการเจริญโดยการนับเซลล์โดยตรงซึ่งเป็นเซลล์ทั้งที่มีและไม่มีชีวิต ดังนั้นจึงได้ทำการหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ที่เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต โดยในการหาเซลล์ที่มีชีวิตนั้นทำได้โดยใช้ชุดทดสอบ LIVE/DEAD BacLightTH Bacterial Viability kits ซึ่งพบว่ามี *B. bifidum* ที่ยังมีชีวิตร้อยละ 71.82, 68.61, 71.82, 77.86 และ 73.94 ในชุดการทดลองที่ใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2, *P. pentosaceus* 5S4, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 และ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ

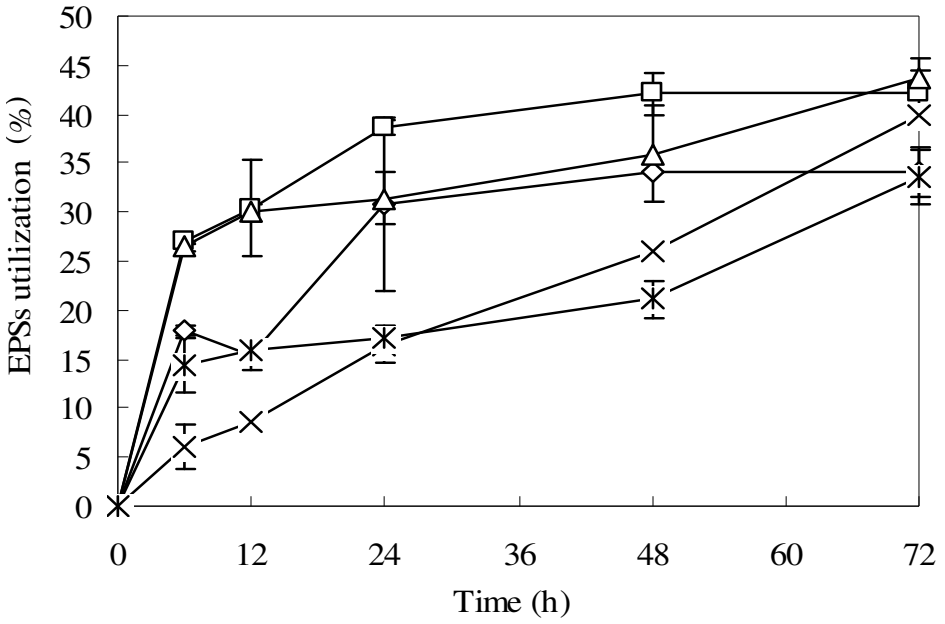


ภาพที่16 การเจริญของ *B. bifidum* ในอาหาร minimal medium ที่มีการเติม EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 (×), *W. confusa* A9 (△), *L. plantarum* A3 (□), *P. pentosaceus* 5S4(◊), และ Glucose (●) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

Figure16. Growth of *B. bifidum* in minimal medium containrd EPSs produced by *W. cibaria* A2 (×), *W. confusa* A9 (△), *L. plantarum* A3 (□), *P. pentosaceus* 5S4 (◊) and Glucose (●) as carbon sources at 37 ^{o}C for 72 h.

เมื่อพิจารณาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของ EPSs ต่อ *B. bifidum* เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติม EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าจำนวนของ *B. bifidum* มีจำนวนมากกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนประมาณ 1 Log cellต่อมิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่ง EPSs ส่วนที่มีการนำไปใช้ในการเจริญนั้นอาจเป็นส่วนที่เกิดจากการถูกย่อยไปบางส่วนในขั้นตอนการ ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Korakli

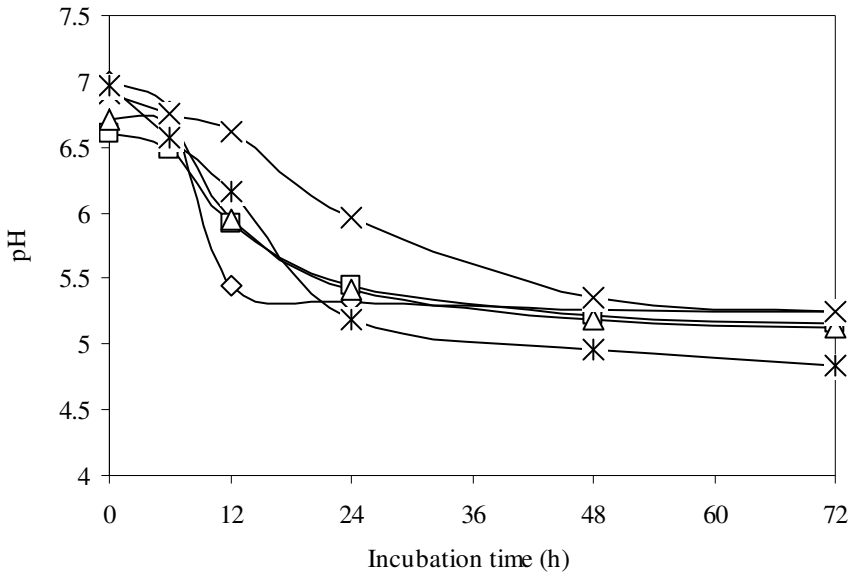
และคณะ (2002) ที่พบว่า EPSs ที่ผลิตโดย *L. sanfranciscensis* TMW1.392 จะถูกย่อยไปบางส่วนในกระบวนการในการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงทำให้ EPSs ที่ได้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ EPSs ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของ *B. bifidum* โดยวัดในรูปของน้ำตาลทั้งหมด แล้วเปรียบเทียบกับน้ำตาลทั้งหมด (EPSs) ที่มีการเติมตอนเริ่มต้น พบว่า *B. bifidum* สามารถใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 และ *W. confusa* A9 ไปในการเจริญได้อย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมงและมีแนวโน้มคงที่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4 จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงและ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 จะเพิ่มขึ้นในเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงและคงที่เมื่อเวลาผ่านไปโดยเมื่อใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 เป็นแหล่งคาร์บอนถูกนำไปใช้มากที่สุดคือร้อยละ 43.57 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อมีการใช้ EPSs ที่ผลิตจาก *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9 และ *P. pentosaceus* 5S4 มีการนำไปใช้ร้อยละ 33.97, 42.19 และ 39.97 ตามลำดับ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ร้อยละของการนำ EPSs ไปใช้โดย *B. bifidum* ในอาหาร minimal medium ที่เติม EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3 (△), *P. pentosaceus* 5S4 (×) และGlucose (∗) เป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

Figure17. Percentage of EPSs utilization by *B. bifidum* in minimal medium containing EPSs produced by *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3(△), *P. pentosaceus* (×) and Glucose (∗) as carbon sources at 37 ^{o}C for 72 h.

เมื่อทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย *B. bifidum* โดยในอาหารที่มี EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนและวัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าจากพีเอชเริ่มต้นที่ 6.9 เมื่อเวลาผ่านไปค่า พีเอชจะค่อยๆลดลงและจะคงที่ที่เวลา 24 ชั่วโมงแรกและคงที่เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นจนเมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมงจะมีพีเอชสุดท้ายเป็น 5.2 สำหรับพอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 18)และเมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละชนิดของพอลิเมอร์พบว่า เมื่อใช้พอลิเมอร์ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญในพบว่าระดับพีเอชที่เปลี่ยนแปลงมีแนวโน้มที่เหมือนกันและสัมพันธ์กับการเจริญ



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างการหมัก ของ *B. bifidum* ในอาหาร minimal medium ที่ใช้ EPSs ที่ผลิตโดย EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3 (Δ), *P. pentosaceus* 5S4 (×) และ Glucose (∗) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 18. pH change in anaerobic fermentation by *B. bifidum* in minimal medium using EPSs produced by *W. cibaria* A2 (◊), *W. confusa* A9 (□), *L. plantarum* A3(Δ), *P. pentosaceus* 5S4 (×) and Glucose (∗) as carbon sources at 37 ^{o}C for 72 h.

จากการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของ EPSs กับแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งหมด 3 สายพันธุ์ได้แก่ *L. plantarum*, *L. acidophilus* และ *B. bifidum* พบว่ามีเพียง *B. bifidum* เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติม EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งการเจริญนั้นเป็นไปได้น้อย ทั้งนี้เนื่องจาก EPSs ที่ใช้ในการทดสอบถือได้ว่าเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งการที่มี

สารอาหารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะยากต่อการนำไปใช้โดยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Gibson, 2004) ทั้งนี้จากการศึกษาคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของ *B. bifidum* พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการใช้สารอาหารที่กว้าง (Mlobeli *et al*., 2002) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ glycosidase ที่สูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นในทางเดินอาหาร (Tochikuraet *at al*., 1986 อ้างโดย Desjardins and Roy 1990) ซึ่ง Schell และคณะ(2002) ได้ศึกษาถึงระดับลำดับจีโนมของแบคทีเรีย *B. longum* พบว่ามีโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ การสร้างเอนไซม์ (glycosyl hydrolase) เพื่อใช้ในการย่อยและขนส่งสารประกอบในกลุ่ม oligosaccharides เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการสนับสนุนถึงความสามารถของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* ในการย่อยสารกลุ่มนี้ได้ดี นอกจากนี้จากการศึกษาของ Desjardins และ Roy (1990) เกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* จำนวน 22 สายพันธุ์ โดยใช้ API ZYM test kit พบว่าทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ α-galactosidase, β-galactosidase และ α-glucosidase และพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ α-galactosidase ที่สูงมาก ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะกับการย่อย galactosyl-oligosaccharides ซึ่งมีความจำเพาะในการส่งเสริมการเจริญต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* ในทางเดินอาหารของคน (Minami *et. al*., 1985) ในขณะที่ Lee และคณะ (1986, อ้างโดย Desjardins and Roy, 1990) ได้รายงานว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์ α-galactosidase และเอนไซม์ α-glucosidase ใน *L. acidophilus, L. bulgaricus* และ *S. thermophilus* เมื่อทดสอบโดยการใช้ชุดทดสอบเดียวกันนี้ เช่นเดียวกันกับ Xiao และคณะ (2000) ได้ศึกษาพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ α-galactosidase ในแบคทีเรีย *Bifidobacterium* ทุกสายพันธุ์และมีประสิทธิภาพในการย่อยสารที่นำมาทดสอบได้แก่ raffinose ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นในลำไส้ถึง 4 เท่า ดังนั้นอาจจะเป็นเหตุผลที่สามารถนำ EPSs ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดใหญ่ไปใช้ในการเจริญได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ *L. acidophilus* และ *L. plantarum*

จากการทดลองครั้งนี้ที่พบว่า *B. bifidum* เท่านั้นที่สามารถนำ EPSs ไปใช้ได้เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Dell Bello (2001) ซึ่งได้ทดสอบคุณสมบัติของ EPSs ที่ผลิตโดย *L. sanfranciscensis* LTH 1729 และ *L. sanfransiscencis* LTH 2590 โดยเลี้ยงในอาหาร LBB (large bowel model) พบว่ามีเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดี โดยที่สามารถเจริญได้ประมาณ 3 Log CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนในขณะที่ *Lactobacillus* จะเพิ่มขึ้นเพียง 0.8 Log CFUต่อมิลลิลิตร และ 0.5 Log CFUต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงตามลำดับ และจากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของ oligosaccharides ที่ได้จากน้ำนมแม่ (human milk oligosaccharides, HMO) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรีย *B. infantis* เท่านั้น (Ward *et al.,* 2006) นอกจากนี้จากการ

ทดลองของ Mandalari (2006) ที่ได้ศึกษาความเป็นพรีไบโอติกของ pectic oligosaccharides ที่สกัดได้จากด้วยเอนไซม์จากผิวของเปลือกส้มแล้วได้นำมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* สามารถใช้สารดังกล่าวได้ดีกว่า *Lactobacillus* นอกจากนี้จากการทดลองของ Olano-Martin (2002) พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารอาหารแต่ละชนิดที่แตกต่างกันออกไปและจะมีความจำเพาะแต่ละสายพันธุ์ที่ต่างกันออกไป โดยได้ทดลองศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของ pectin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลิแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่และเปรียบเทียบกันกับ pectic-oligosaccharides ซึ่งได้จากการย่อย pectin ให้มีขนาดที่เล็กลงโดยพบว่าอาหารดังกล่าวมีความสามารถในการที่จะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ต่างกันออกไปโดยพบว่า *B. angulatum*, *B. infantis* และ *B. aldolescentis* ไม่สามารถเจริญได้บน pectin แต่สามารถเจริญได้บน pectic oligasaccharides ในขณะที่ *B. thetailtamino*, *Carnobacterium ransus*, *B. lactis* Bb12, *L. plantarum* และ *L. pentosus* สามารถเจริญได้บนอาหารที่เติม pectin แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น pectic oligasaccharides นอกจากนี้ Kaplan และ Hithins (2000) ได้ศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของ fructooligosaccharides ต่อแบคทีเรียโปรไบโอติกซึ่งได้ทดลองใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหาร MRS พบว่าจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้นมี 12 สายพันธุ์ที่สามารถนำสารที่ใช้ทดสอบไปใช้ในการเจริญได้ในขณะที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* สามารถใช้สารดังกล่าวได้จำนวน 7 สายพันธุ์จากทั้งหมด 8 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีความจำเพาะกับสารแต่ละชนิดที่แตกต่างกันออกไปโดยที่แบคทีเรียโปรไบโอติกไม่สามารถที่จะใช้สารทุกชนิดในการเจริญได้

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีพอลิเมอร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าขนาดของพอลิเมอร์มีความสำคัญโดยพบว่าสารประกอบที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มโพลิแซคคาไรด์จะไม่มีความจำเพาะในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกอย่างเช่นการศึกษาของ Marx และ คณะ (2002) ที่พบว่าเมื่อใช้ levan ซึ่งเป็นโพลิแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก พบว่าไม่มีโปรไบโอติกสายพันธุ์ใดเลยที่สามารถเจริญได้แต่เมื่อนำ levan มาย่อยให้มีขนาดที่เล็กลงพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกในทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ซึ่งจากแนวคิดดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของพรีไบโอติกได้โดยการทำให้พรีไบโอติกมีขนาดเล็กลงเพื่อการนำไปใช้ได้ดีกว่าโดยโปรไบโอติก จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดไม่สามารถใช้สารอาหารได้ทุกชนิดโดยที่อาหารแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกันกับชนิดของ

แบคทีเรียซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของกระบวนการในการย่อยและการขนส่งสารเข้าเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (Monsan and Paul, 1995)

การทดลองในครั้งนี้เป็นการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ EPSs ว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้หรือไม่โดยการใช้โปรไบโอติกบางสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบ ซึ่งในความเป็นจริงในระบบทางเดินอาหารของคนเราจริงๆจะมีองค์ประกอบอื่นที่ซับซ้อนกว่า และมีจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่มากกว่า ดังนั้นอาจจะมีแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์อื่นที่สามารถใช้สารที่นำมาทดสอบได้นอกจากนี้ในสภาวะความเป็นจริงในลำไส้ใหญ่จะเป็นการอยู่รวมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งอาจจะอยู่ร่วมกันในลักษณะที่ metabolize ของสายพันธุ์หนึ่งอาจจะเป็นสารตั้งต้นในการเจริญของแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่งได้ (Gibson and Roberfroid, 1995) ดังนั้นในสภาวะความเป็นจริงในลำไส้ใหญ่ EPSs อาจจะสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆได้ นอกจากนี้จากคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของ EPSs ที่สามารถทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนได้ดีนั้น เป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจที่จะนำพอลิเมอร์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้งานในด้านการเป็นชนิดห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อให้เหลือรอดไปยังลำไส้ใหญ่ได้หากมีการศึกษาต่อได้

3.4.3.1 ปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids) ที่ได้จากการหมัก EPSs ของ *B. bifidum*

วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ได้จากการหมัก EPSs โดยวิธี Gas Chromatography-Flam Ionization Detector (GC-FID) พบว่าสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิดได้แก่ กรดโพรพิออนิก กรดบิวทาริก และกรดอะซิติก โดยผลิต กรดอะซิติกปริมาณสูงสุดคือ ผลิตได้ในช่วง 8.6-13.4 mM โดยที่เมื่อมีการใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้กรดอะซิติกในปริมาณที่มากที่สุดคือ 13.40 mM และเมื่อใช้ EPSs ที่ผลิตจาก *L. plantarum* A3 จะพบปริมาณกรดอะซิติกในปริมาณน้อยที่สุดคือ 8.69 mM ในขณะที่การใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9, *W. cibaria* A2 และ *P. pentosaceus* 5S4 จะพบการสร้าง กรดอะซิติกในปริมาณ 11.58 11.40 และ 9.97 mM ส่วนการผลิต กรดโพรพิออนิกและกรดบิวทาริกพบว่า มีการผลิตได้ในปริมาณที่น้อยคือ 0.24 – 0.25 และ 0.16-0.17 mM ตามลำดับ โดยที่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันปริมาณกรดที่มีการผลิตจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 16) โดยพบว่าการสร้างกรดไขมันสายสั้นของ *B. bifidum* เมื่อเจริญในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันมีความสัมพันธ์กับการเจริญและการนำ EPSs ใช้ในการเจริญ เช่น เมื่อเลี้ยง *B. bifidum* เจริญในอาหารที่มีการเติม EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 มีการเจริญสูงสุด และพบว่ามีการผลิต กรดไขมันสายสั้นในปริมาณที่มากเช่นเดียวกัน จากการทดลองครั้งนี้ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ได้มีค่าน้อยกว่าลำไส้จริงแต่ในสภาวะความเป็นจริงในลำไส้ใหญ่นั้นจะมีอัตราส่วน

ของกรด อะซิติก:โพรพิออนิก:บิวทาริก ในอัตราส่วน55:20:15 (Cumming and Macfarlane, 1991) แต่จากการทดลองในครั้งนี้ตรวจพบกรดอะซิติกในอัตราที่สูงมากเมื่อเทียบกับ กรดโพรพิออนิก และบิวทาริกทั้งนี้อาจเนื่องจากในการทดลองครั้งนี้เป็นการใช้เชื้อ *B. bifidum* ซึ่งเป็นเชื้อเดี่ยวๆ และปกติเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกเป็นชนิดหลักอยู่แล้วจึงทำให้พบกรดชนิดนี้มากกว่าปกติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณของกรดบิวทาริกซึ่งมีปริมาณ 0.15 mM โดยในการศึกษาพบว่าปริมาณของบิวทาริกความเข้มข้นที่พบในทางเดินอาหารปกติเท่ากับ 12-20 mM (Smith and German, 1995) อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วในลำไส้ใหญ่จะประกอบไปด้วยกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายมากกว่า 500 สายพันธุ์จึงทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

ตารางที่ 16 ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นในการหมักแบบไร้ออกซิเจนโดย *B. bifidum* ในอาหาร minimal medium ที่มีการเติม EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง

Table 16. Short chain fatty acid formation in anaerobic fermentation by *B. bifidum* in minimal medium containing EPSs as carbon sources at 37 ^{o}C for 48 h.

Sources of EPSs	Short chain fatty acid (mM)		
	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
W. cibaria A2	11.401 ± 0.612^{ab}	0.240 ± 0.006^{a}	0.159 ± 0.000^{a}
W. confusa A9	11.578 ± 0.820^{ab}	0.252 ± 0.004^{a}	0.168 ± 0.005^{a}
L. plantarum A3	8.696 ± 0.490^{b}	0.242 ± 0.007^{a}	0.159 ± 0.009^{a}
P. pentosaceus 5S4	9.973 ± 1.831^{b}	0.225 ± 0.004^{a}	0.166 ± 0.006^{a}
Glucose	13.400 ± 1.185^{a}	0.248 ± 0.017^{a}	0.157 ± 0.001^{a}

3.4.3.2 ผลของ EPSsในการส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของ *B. bifidum*

เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการแยกเซลล์ *B. bifidum* มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Stap. aureus, Sal.* Typhi, และ *E. coli* โดยวิธี microdilution test พบว่าไม่มีกิจกรรมการยับยั้งของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *B. bifidum* ในอาหารที่ใช้ EPSs และ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญของ *B. bifidum* เป็นไปได้น้อยจึงทำให้มีการผลิตกรดซึ่งมีบทบาทในการ

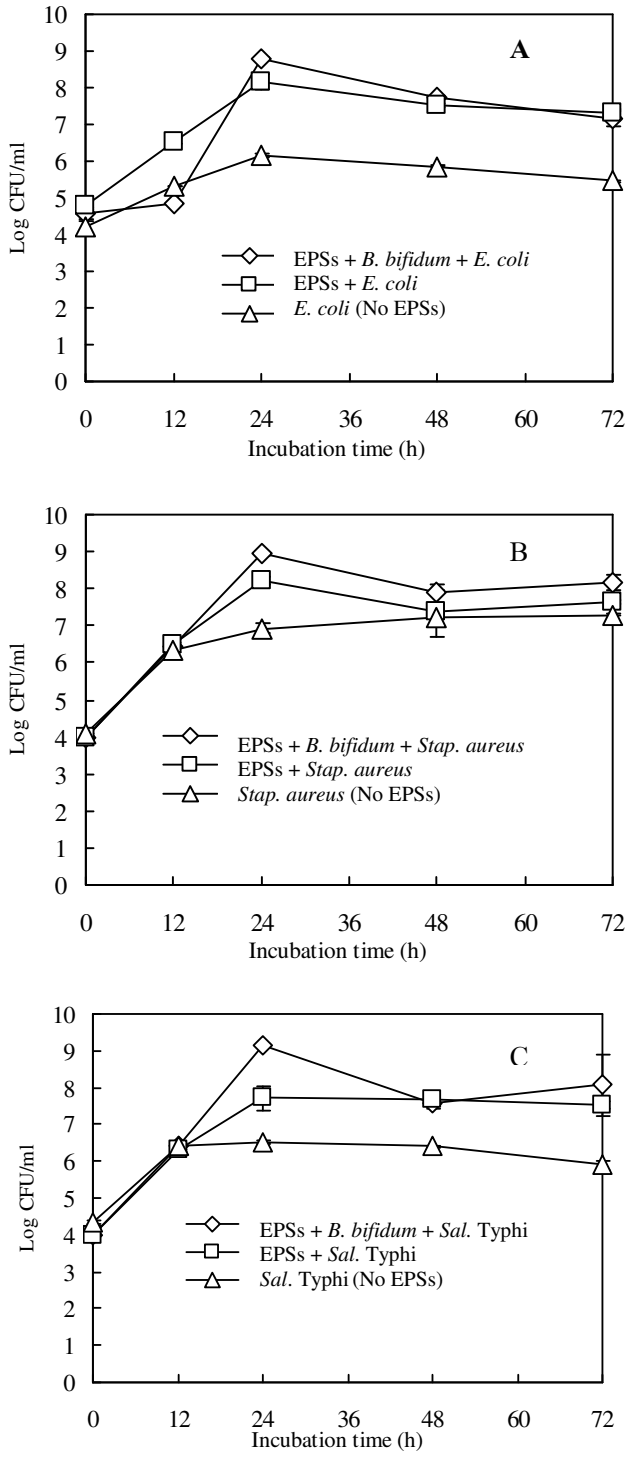
ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้น้อย โดยเฉพาะกรดอะซิติกซึ่งเป็นกรดหลักที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตได้ โดยในการทดสอบครั้งนี้ผลิตได้ในช่วงประมาณ 8.6-13.4 mM ซึ่งไม่สูงพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ เนื่องจากความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคคือต้องมากกว่าร้อยละ 0.06 (9.9 mM) ดังนั้นจากความปริมาณกรดดังกล่าวจึงทำให้ไม่พบการยับยั้ง ถึงแม้ว่าในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *E. coli*, *Stap. aureus*, *Shigella dysenteriae* และ *Sal.* Typhi ได้ก็ตาม (Rasic, 1983 อ้างโดย Leahy *et.al*., 2005)

3.4.4 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกในอาหารที่มี EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทดสอบการยับยั้งของ *B. Bifidum* ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่มีการเติม EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกันกับ *E. coli* พบว่าจำนวนของ *E. coli* ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆ มีจำนวนที่ใกล้เคียงกันคือ 7.15และ 7.32 Log CFUต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 19A) ตามลำดับเช่นเดียวกันกับชุดการทดลองที่เลี้ยง *Stap. aureus* ร่วมกันกับ *B. bifidum* พบว่าชุดที่เลี้ยงร่วมกันและชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆมีจำนวนของ *Stap. aureus* เท่ากับ 8.17 และ 7.65 Log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 19B) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดการยับยั้ง ทำนองเดียวกันกับการทดสอบกับ *Sal.* Typhi พบว่ามีจำนวน 8.06 และ 7.5 Log CFUต่อมิลลิลิตร ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆตามลำดับ(ภาพที่ 19C) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *B. bifidum* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบได้นอกจากนี้ยังพบว่า *Stap. aureus*, *Sal.* Typhi และ *E. coli* สามารถนำ EPSs ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ด้วยเนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ในชุดการทดลองที่มีการเติม EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนซึ่งมีการเจริญ 7.29, 5.9 และ 5.45 Log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และจากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดย *B. bifidum* ในอาหารที่มีการใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเจริญของ *E. coli* ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันระหว่าง *B. bifidum* และชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆที่เวลา 72 ชั่วโมงเป็น 7.67 และ 7.02 Log CFU ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 20A) ในขณะที่เมื่อทดสอบการยับยั้งต่อ *Stap. aureus* พบว่ามีการเจริญที่เวลา 72 ชั่วโมงเป็น 7.76 และ 7.9 Log CFUต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และเลี้ยงเดี่ยวๆ ตามลำดับ (ภาพที่ 20B) ทำนองเดียวกันกับการเจริญของ *Sal.* Typhi ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆ พบว่ามีการเจริญที่เวลา 72 ชั่วโมงเป็น 5.77 และ 5.7 Log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 20C) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า *B. bifidum* ไม่

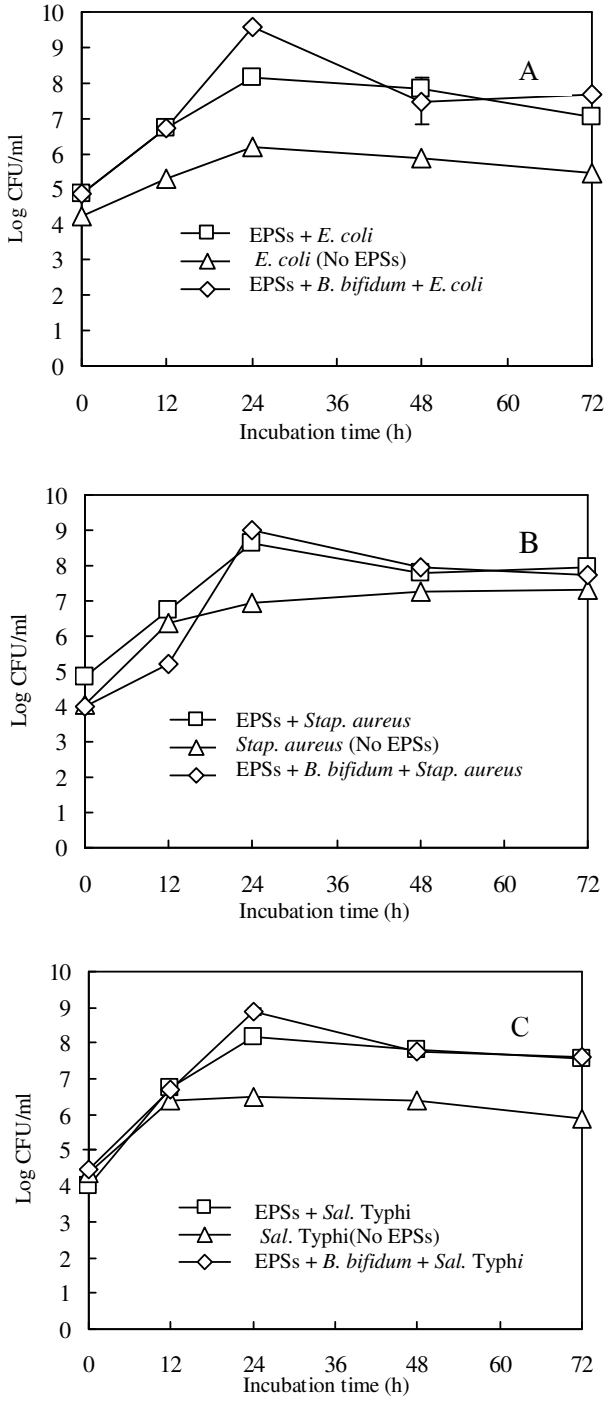
สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง สามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบเมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่มี EPSs ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่า *E. coli* และ *Sal.* Typhi สามารถนำ EPSs ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ด้วยเนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนสูงกว่าการเจริญของชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนในขณะที่ *Stap. aureus* สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติม EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการที่แบคทีเรียก่อโรคสามารถใช้พรีไบโอติกในการเจริญได้นั้นได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Dell Bello (2001) ซึ่งได้ศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของ EPSs ที่ผลิตโดย *L. sanfranciscensis* LTH 1729 และ *L. sanfransiscencis* LTH 2590 พบว่านอกจากจะสามารถส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium* แล้วยังส่งเสริมการเจริญของ *Clostridium*, *Bacteriodes* และแบคทีเรียในกลุ่ม coliforms ได้อีกด้วยซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับการศึกษาความเป็นพรีไบโอติกของ Fructooligosaccharides (FOS) พบว่านอกจาก FOS จะส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium* แล้วยังส่งเสริมการเจริญของ *Bacteroides* sp., *Mituokella* sp., *Clostrium* sp. และ *Eubacterium* sp. ได้อีกด้วย (Yamada *et. al.,* 1993) นอกจากนี้จากการทดลองของ Jaskari และคณะ (1998) ซึ่งได้รายงานว่า FOS ที่ได้จาก oat β-glucan และ xylan hydrolysates สามารถชักนำการเจริญของ *Bacteriodes* sp. และ *Clostridium* sp. ได้เช่นกัน เช่นเดียวกันกับ gentio-oligosaccharides ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ β 1-6 นอกจากจะสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกแล้วยังสามารถส่งเสริมการเจริญของ *E. coli* ได้อีกด้วย (Rycroft, 2001) และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ten Bruggencate (2004) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยการให้ oligosaccharides และ Inulin แก่หนู (Male Wistar rats) พบว่านอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* จะเพิ่มขึ้นแล้ว *Salmonella* ก็มีการเจริญเช่นกัน



ภาพที่ 19 การเจริญของ *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) ใน minimal medium ซึ่งมี EPSs ที่ ผลิตโดย *W. cibaria* A2 เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure19. Growth of *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) in minimal medium containing EPSs produced by *W. cibaria* A2 as a carbon source.



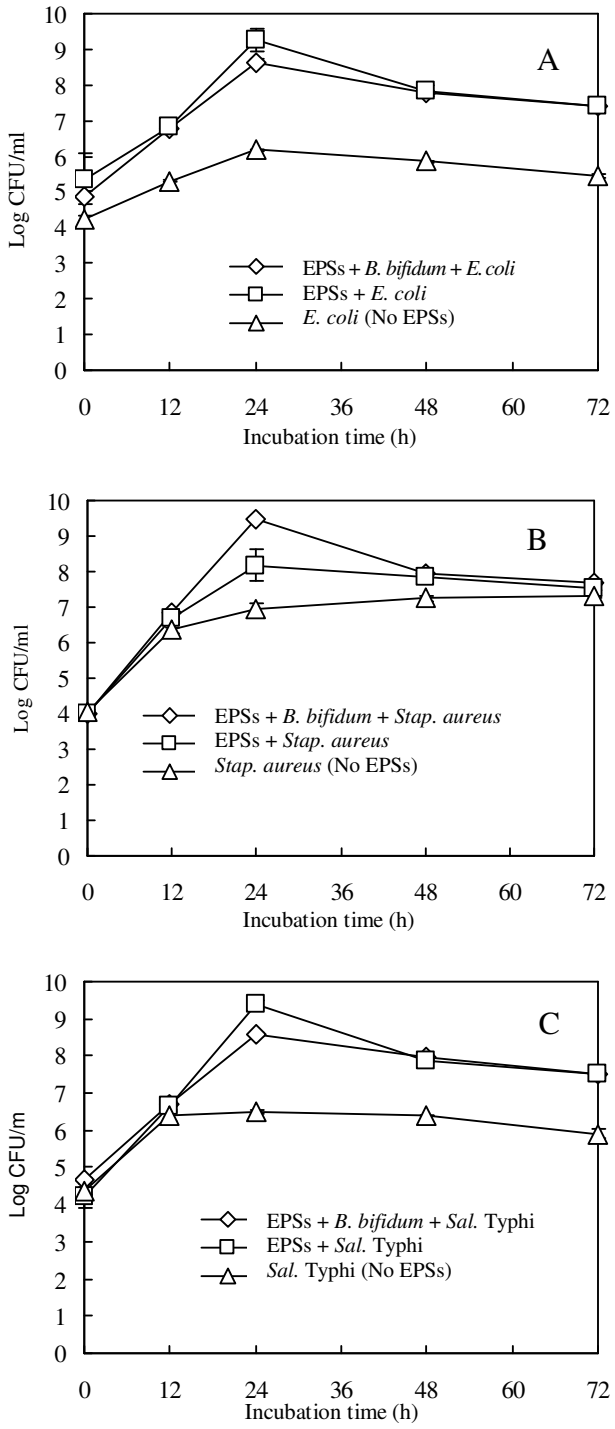
ภาพที่ 20 การเจริญของ *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) ใน minimal medium ซึ่งมี EPSs ที่ผลิตโดย *W. confusa* A9 เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 20. Growth of *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) in minimal medium containing EPSs produced by *W. confusa* A9 as a carbon source.

เมื่อทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *B. bifidum* เมื่อเลี้ยงร่วมกัน โดยมี EPSs ที่ผลิต โดย *P. pentosaceus* 5S4 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญของ *E. coli* ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* ชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆ มีการเจริญที่เวลา 72 ชั่วโมง เป็น 7.41และ 7.40 Log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 21A) ทำนองเดียวกันกับ *Stap. aureus* พบว่ามีการเจริญเท่ากับ 7.60 และ 7.54 Log CFUต่อมิลลิลิตร ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยว (ภาพที่ 21B) นอกจากนี้เมื่อทดสอบกับ *Sal.* Typhi พบว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* จะมีจำนวน 7.49 Log CFUต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเดี่ยวๆ พบว่ามีการเจริญเท่ากับ 7.51 Log CFUต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดสอบพบว่าไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียก่อโรคและ *B. bifidum* (ภาพที่ 21C)

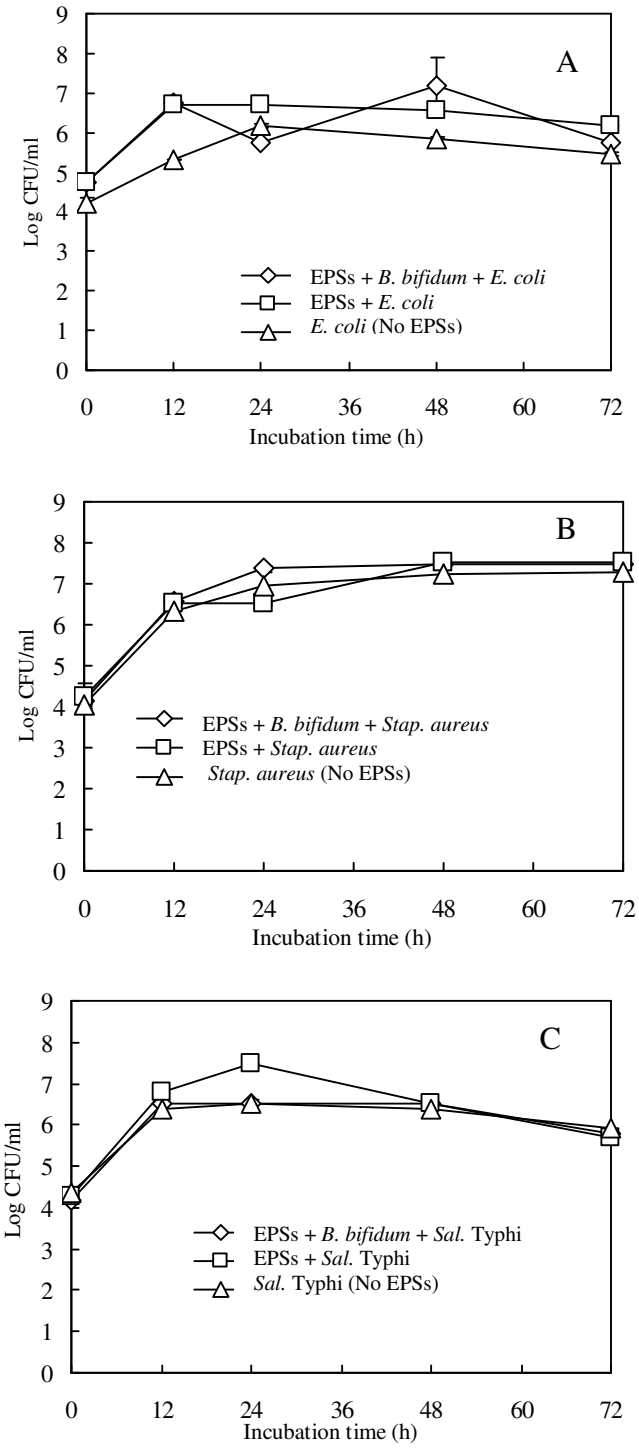
เมื่อทดสอบการยับยั้ง ของ *B. bifidum* ต่อแบคทีเรียก่อโรคเมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่มี EPSs ที่ผลิตโดย *L. plantarum* A3 เป็นแหล่งคาร์บอนพบการเจริญของ *E. coli* เมื่อเลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และเลี้ยงเดี่ยวๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมงเป็น 5.76 และ 7.6 Log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 22A) ทำนองเดียวกันกับ *Stap. aureus* 72 ชั่วโมง เป็น 7.47 และ 7.5 Log CFUต่อมิลลิลิตร ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* และชุดการทดลองที่เลี้ยงเดี่ยวๆ (ภาพที่ 22B) นอกจากนี้เมื่อทดลอบการยับยั้งต่อ *Sal.* Typhi พบว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกันกับ *B. bifidum* มีการเจริญที่เวลา 72 ชั่วโมงเป็น 5.77 และ 5.70 Log CFUต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 22C) จากการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบพบว่า *B. bifidum* ไม่สามารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *B. bifidum* และแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามสายพันธุ์ ไม่ถูกยับยั้งโดย *B. bifidum* เมื่อมีการเจริญร่วมกันในอาหารที่มี EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องจาก การเจริญของ *B. bifidum* ในอาหารที่มี EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นไปได้น้อย จึงทำให้สร้างสารที่มีบทบาทไปยับยั้งและการแย่งสารอาหารมีน้อยด้วย นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคโดยการใช้ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่ามีแบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้ EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งในความเป็นจริงนั้นการที่จะหาสารที่มีความจำเพาะต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกเพียงอย่างเดียวนั้นถือว่าทำได้ยาก โดยในสภาวะในทางเดินอาหารจริงๆ จุลินทรีย์ก่อโรคอาจจะใช้สารนั้นได้แต่ด้วยในสภาวะที่มีการเจริญของโปรไบโอติกที่มากกว่าทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถที่จะเจริญได้เต็มที่ด้วยกลไกต่างๆ เช่นการสร้างสารมายับยั้ง ความสามารถในการแย่งสารอาหาร หรือจะเป็นการแย่งพื้นที่ในการเกาะในผนังลำไส้ เป็นต้น



ภาพที่ 21. การเจริญของ *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) ใน minimal medium ซึ่งมี EPSs ที่ผลิตโดย *P. pentosaceus* 5S4 เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 21. Growth of *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) in minimal medium containing EPSs produced by *P. pentosaceus* 5S4 as a carbon source.



ภาพที่ 22 การเจริญของ *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) ใน minimal medium ซึ่งมี EPSs ที่ ผลิตโดย *L. plantarum* A3 เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 22. Growth of *E. coli* (A), *Stap. aureus* (B), *Sal.* Typhi (C) in minimal medium containing EPSs produced by *L. plantarum* A3 as a carbon source.

จากการศึกษาที่ได้รายงานมานั้นจะสังเกตเห็นได้ว่าความจำเพาะของสารประกอบที่คาดว่าเป็นพรีไบโอติกนั้นมีความแตกต่างกันออกไปมีสารหลายชนิดมากที่ทั้งแบคทีเรียกลุ่มโปรไบโอติกและแบคทีเรียสามารถใช้สารดังกล่าวได้ทั้งนี้เนื่องจากความจำเพาะของโครงสร้างของพอลิเมอร์และเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียแต่ละชนิดหรืออาจจะเกิดจากขนาดโมเลกุลของสารที่แตกต่างกัน ซึ่ง Olano–Martin (2002) ได้สรุปว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่มีความจำเพาะในการส่งเสริมการเจริญต่อแบคทีเรียโปรไบโอติกได้น้อย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อมีการเจริญของโปรไบโอติกได้น้อยจึงทำให้แบคทีเรียในกลุ่มอื่นที่ไม่ต้องการ ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคสามารถเจริญได้ด้วยซึ่งในการทดลองในครั้งนี้เป็นการใช้ EPSs ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดใหญ่ทำให้นอกจากโปรไบโอติกจะสามารถนำสารไปใช้ได้แล้ว แบคทีเรียก่อโรคเองก็สามารถใช้ได้ด้วยเนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีความจำเพาะในการเลือกที่จะส่งเสริมการเจริญเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกเพียงอย่างเดียว จากการที่ทดสอบการเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคโดยการใช้ EPSs เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่า EPSs ไม่มีบทบาทในการส่งเสริมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *B. bifidum* ซึ่งการทดลองดังกล่าวเป็นการทดลองในสภาวะจำลองเท่านั้น แต่ในความเป็นจริงภายในลำไส้ใหญ่นั้น บทบาทของพรีไบโอติกนอกจากจะส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกในการที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแล้วยังมีบทบาทในการป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้เกาะผนังลำไส้ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียโดยทั่วไปจะใช้ carbohydrate–binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นบทบาทหนึ่งของพรีไบโอติกในการที่จะลดแบคทีเรียก่อโรคก็คือการไปจับกับแบคทีเรียและผนังของลำไส้แทนการที่แบคทีเรียจะไปจับกับลำไส้ทำให้ลดการเกิดโรคลงได้ (Zopf, 1996 อ้างโดย Korakli *et al*., 2006) ซึ่งจากการศึกษาของ Coppa และคณะ (2006) พบว่า oligosaccharides ที่ได้จากนมแม่มีบทบาทในการป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *E. coli*, *Vibrio cholerae* และ *Sal. fyris* ต่อผนังลำไส้