บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

2.1 ตัวอย่าง ปลา กุ้ง หอย ที่มีลักษณะสด ซึ่งเก็บจากจากตลาดสดพลาซ่า ตลาดคลองเรียน อำเภอหาดใหญ่ กระชังเลี้ยงปลาที่เกาะยอ และ แพปลา ที่ อำเภอเมือง จังหวัด สงขลาโดยนำตัวอย่างมาเก็บในน้ำแข็งระหว่างที่นำมาวิเคราะห์โดยควรวิเคราะห์ให้เร็วที่สุดเท่าที่ทำได้และไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมง

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์	ที่มา
Escherichia coli 0157: H7	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี
Salmonella sp.	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Staplylococcus aureus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Lactobacillus acidophilus TISTR 1034	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)
Lactobacillus plantarum TISTR 875	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)
Bifidobacterium bifidum DSM 20456	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) เยอรมัน
Aspergillus fumigatus TISTR 3180	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)
Saccharomyces cerevisiae var. sake (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Salmonella Typhi	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Chemical and Media	Grade /Company
1.H_2SO_4	Analytical /Merck, Germany
2. HCl	Analytical /Lab scan, Thailand
3. NaOH	Analytical/Merck, Germany
4. Nutrient Agar (NA)	Analytical/Labscan, Thailand
5. Nutrient Broth (NB)	Analytical/Labscan, Thailand
6. Mueller Hinton Agar (MHA)	Analytical/Himedia, India
7. Mueller Hinton Broth (MHB)	Analytical/Himedia, India
8. De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Analytical/Himedia, India
9. Tween 80	Analytical/Ajex Finechem, Australia
10. Nitrogen gas	Comercial Grade 98 %
11. NaCl	Analytical/Merck, Germany
12. KCl	Analytical/Ajex Finechem,Australia
13. Na_2HPO_4 $2H_2O$	Analytical/Ajex Finechem, Australia
14. NaH_2PO_4	Analytical/Ajex Finechem, Australia
15. $CaCl_2 2H_2O$	Analytical/Ajex Finechem, Australia
16. $MgCl_2$ $6H_2O$	Analytical/Ajex Finechem, Australia
17. Na_2SO_3	Analytical/Ajex Finechem, Australia
18. Phenol	Analytical/Flucka, Germany
19. peptone water	Analytical/Merck, Germany
20. yeast extract	Analytical/Himedia, India
21. K_2HPO_4	Analytical/Ajex Finechem, Australia
22. KH_2PO_4	Analytical/Ajex Finechem, Australia
23. $CaCl_2.6H_2O$	Analytical/Ajex Finechem, Australia
24. $MgSO_4.7H_20$	Analytical/Ajex Finechem, Australia
25. $NaHCO_3$	Analytical/Ajex Finechem, Australia
26. L-cysteine	Analytical/ Flucka, Germany
27. Bile salt	Analytical/Himedia, India

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ(ต่อ)	
Chemical and Media	Grade/Company
28. $C_{12}H_6NO_4Na$ (rezasurin)	Analytical/Singma, Germany
29. Human pancreatic α-amylase	Analytical/Sigma, Germany
30. D-Glucose	Analytical/Ajex Finechem, Australia
31. D-fructose, lactose, galactose	Analytical/Singma, Germany
32. LIVE/DEAD®BacLight™ Bacterial Viability kit L7007	Analytical/Invitrogen, USA
33. Ruthenium red	Analytical/Singma, Germany
34. $C_2OH_{10}N_2O_4Na.H_2O$ (disodium 2,2 – bicinchoninate)	Analytical/Singma, Germany
35. $C_3H_7NO_3$ (L-serine)	Analytical/Singma, Germany

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Mettler Toledo, USA
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorious, USA
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach, Germany
ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Scientific promotion, USA
ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Tomy Seiko, Japan
ถาด 96 หลุม (Microtiter plate 96 flat bottom WI)	NUNC™, Denmark
Microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek, UK
พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettler Toledo, USA
ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	Labmate, USA
ไมโครปิเปต (ขนาด 1000ไมโครลิตร)	Gilson, France
Multichanels pipet (ขนาด20-200 ไมโครลิตร)	Transferpette, USA
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB 14	Schwabach, Germany
Microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek, UK

วิธีการทดลอง

2.1 คัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิต EPSs

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลา กุ้ง หอย ที่มีลักษณะสดโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกเช่น เนื้อไม่เละและกลิ่นต้องไม่เหม็นเน่า โดยเก็บจากจากตลาด พลาซ่า ตลาดคลองเรียน ในอำเภอหาดใหญ่ เกาะยอ และท่าเรือในอำเภอเมืองสงขลา โดยเก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกปิดสนิทใส่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งในระหว่างการนำตัวอย่างมารอวิเคราะห์เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ตามข้อ 2.1.2

2.1.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs บนอาหารแข็ง

ทำการแยกเครื่องในจากตัวอย่างโดยตัวอย่างที่เป็นหอยจะใช้ทั้งตัวมาบดแยกเชื้อแต่ในกรณีที่แยกเชื้อจากปลาและกุ้งทำโดยล้างภายนอกให้สะอาดและเช็ดภายนอกปลาด้วยเอทานอล (ร้อยละ 70) เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวแล้วใช้มีดที่ผ่านการเผาไฟเพื่อทำให้ปลอดเชื้อมาผ่าทางเดินอาหารออกมาตัดให้ละเอียดและนำไปตีปั่นด้วย stomacher เป็นเวลา 4 นาทีในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 5 กรัมในน้ำทะเลปริมาตร 45 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} นำมาแยกเชื้อโดยการ spread plate ในอาหาร MRS ที่มีการเติมและไม่เติมสี ruthenium red (RR) ซึ่งใช้ในการตรวจสอบการผลิต EPSs และมี น้ำตาลต่างกัน 4 ชนิดคือ กลูโคส ซูโครส แลคโตส และ ฟรุคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนเพื่อศึกษาถึงผลของออกซิเจนต่อการสร้าง EPSs ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้าง EPSs โดยคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร MRS ที่มีลักษณะเยิ้ม เมื่อนำลูปมาแตะยกขึ้นแล้วเกิดเป็นเส้นยืดเหนียวๆ และโคโลนีสีขาวบนอาหาร MRS ที่เติมสี RR มา restreak บนอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลที่โคโลนีนั้นเจริญเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs ในเชิงปริมาณ

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPSs ได้ในปริมาณสูงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.1.2 โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ EPSs ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตได้จากการเจริญในอาหารเหลว MRS ที่ใช้น้ำตาล ชนิดเดียวกันกับที่แยกสายพันธุ์นั้นได้ร้อยละ 2 ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำน้ำหมักไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอาตัวเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของส่วนใสที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำ EPSs ที่ได้มาทำให้แห้งในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมงหลัง

จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วรายงานความสามารถในการผลิต EPSs ที่ได้เป็นกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิต EPSs ได้ในปริมาณที่สูงใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป(ดัดแปลงจาก Smitinont, *et al*., 1999)

2.2 การจำแนกแบคทีเรียแลกติก

จัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยใช้ 16s rDNA โดยการส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสที่ Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นำลำดับเบส 16s rDNA ที่ได้ไปเทียบลำดับเบสที่มีอยู่ใน nr database ที่มีข้อมูลในอินเตอร์เน็ตโดยใช้เวปไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nim.gov ด้วยโปรแกรม BLAST

2.3 กิจกรรมทางชีวภาพของ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

2.3.1 คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

2.3.1.1 การทดสอบการทนต่อการย่อยโดยกรด

นำ EPSs ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 63) มาละลายในไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 140 mM (140 mM HCl buffer) (Korakli *et al*., 2002) แล้วนำมาปรับพีเอชด้วย 5 M HCl ให้ได้ระดับพีเอช 1 2 และ 3 แล้วนำมาบ่มพร้อมทั้งเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 4 ชั่วโมง ปรับพีเอชของตัวอย่างให้เป็นกลางด้วย 5 M NaOH เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยาของกรด หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมงมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric acid method (Fox and Robyt, 1991) และน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Copper-bicinchoninate (Fox and Robyt, 1991) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโดย

$$\text{Hydrolysis (\%)} = \frac{\text{Reducing sugar release (Final – Initial sugar)} \times 100}{\text{Total sugar content – Initial reducing sugar before acid digestion}}$$

2.3.1.2 การทดสอบการทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase

นำ EPSs มาผ่านการย่อยโดยกรดที่พีเอช 1 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วปรับพีเอชให้เป็น 6.9 โดยใช้ 1 M NaOH จึงเติมเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Copper-bicinchoninate (Fox and

Robyt, 1991) นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโดย เอนไซม์ human pancreatic α-amylase ดังนี้

$$\text{Hydrolysis (\%)} = \frac{\text{Reducing sugar release (Final – Initial sugar)} \times 100}{\text{Total sugar content – Initial reducing sugar before enzymatic digestion}}$$

2.3.1.3 ผลของการใช้ EPSs ต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก 3 สายพันธุ์ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1034 *L. plantarum* TISTR 875 และ *B. bifidum* DSM 20456 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium (peptone water 2.0 กรัมต่อลิตร yeast extract 2 กรัมต่อลิตร NaCl 0.1 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.04 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.04 กรัมต่อลิตร $CaCl_2.6H_20$ 0.01 กรัมต่อลิตร $NaHCO_3$ 2 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_20$ 0.01 กรัมต่อลิตร bile salts 0.5 กรัมต่อลิตร Tween 80 2 มิลลิลิตรต่อลิตร hemin 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตรและ L-cysteine 0.5 กรัมต่อลิตร) ที่มี EPSs และน้ำตาลกลูโคส (positive control) ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหาร minimal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน (negative control) โดยเลี้ยงโปรไบโอติกซึ่งอยู่ในระยะ log phase โดยเลี้ยงที่เวลา 18 ชั่วโมงในอาหาร M58 สำหรับ *B. bifidum* และในอาหาร MRS สำหรับ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เติมแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเป็น 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาวัดการเจริญโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรสำหรับ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* และนับโดยใช้ Hemacytometer (ภาคผนวก ข) สำหรับ *B. bifidum* แล้วรายผลเป็น Log cellต่อมิลลิลิตร (Olano Martin, 2000) และหาร้อยละของการมีชีวิตโดยใช้ LIVE/DEAD BacLightTH Bacterial Viability kits (Invitrogen) (ภาคผนวก ข) พร้อมทั้งวัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชโดยเครื่องวัดพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณ EPSs ที่เหลือโดยวิธี Phenol sulfuric methods (ภาคผนวก ข) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐานแล้วรายผลเป็นร้อยละของการนำ EPSs ไปใช้โดยเปรียบเทียบที่เวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการเจริญ โดย คำนวณปริมาณ EPSs ที่ถูกใช้ไปดังนี้

$$\text{ร้อยละของการใช้ EPSs} = \frac{\text{EPSs เริ่มต้น – EPSs สุดท้าย}}{\text{EPSs เริ่มต้น}} \times 100$$

2.3.1.4 ผลของการใช้ EPSs ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของโปรไบโอติก

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดย EPSs ในข้อ 2.3.1.3 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาทีเป็นเวลาเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เพื่อแยกตัวเซลล์ออกแล้ว นำส่วนใสมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *Stap. aureus* โดยวิธี microdilution test (Lorian, 1980) ซึ่งทดสอบโดยการนำส่วนใสที่เจือจาง 2 เท่า และที่ไม่เจือจาง ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุมแบบ 96 หลุม แล้วเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบที่เตรียมให้อยู่ในระยะ log phase (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร ด้วยอาหาร MHB มีหลุมที่เป็น positive control ซึ่งเติมอาหาร minimal medium และ negative control ที่มีองค์ประกอบเหมือนกันกับชุด positive control แต่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มถาดหลุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยวัด ความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรโดยเครื่อง microplate reader ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบโดยหากหลุมใดที่ไม่ขุ่น (เทียบกับ negative control) แสดงว่าส่วนใสนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบได้แล้วรายผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (Minimal inhibition concentration, MIC)

2.3.1.5 ผลของ EPSs ต่อการผลิต กรดไขมันสายสั้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 2.3.1.3 ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมงมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตัวเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร เติมกรด orthophosphoric ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ diethyl ether ปริมาตร 3 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) แล้วตั้งไว้ให้แยกชั้นระหว่างน้ำหมักและชั้นของ diethyl ether แล้วดูดชั้นของ diethyl ether ซึ่งอยู่ด้านบนด้วยไมโครไปเปตเก็บไว้ ส่วนตัวอย่างที่เหลือนำมาสกัดซ้ำเช่นเดิมด้วย diethyl ether อีก 2 ครั้ง แล้วนำชั้น diethyl ether มารวมกันเพื่อ นำไปวิเคราะห์ หาปริมาณกรดไขมันสายสั้นด้วย GC-FID ซึ่งใช้คอลัมน์ HP-INOVEX ชนิด polyethylene glycol (HP 19091N-133E) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 230 องศา-เซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 80 องศาเซลเซียส และเพิ่มเป็น 210 องศาเซลเซียส ในเวลา 15 นาที อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียสใช้กรด บิวทาริก อะซิติก และ โพรพิออนิก ที่ความเข้มข้น 10 50 75 และ 100 mM เขียนเป็นกราฟสารมาตรฐาน (ผนวก ข) แล้วเทียบกับสารในตัวอย่างที่ออกมาเวลา (retention time) เดียวกันแล้วคำนวณหาปริมาณของสารแต่ละชนิดในตัวอย่างน้ำหมักโดยใช้สมการที่ได้จากการเขียนกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด (ดัดแปลงจาก Laurentin, 2003)

2.3.1.6 การศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกในอาหารที่มี EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. bifidum* ในอาหาร M58 (กรัมต่อลิตร: Casien peptone, tryptic digest 10, 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 ($CaCl_2$. $2H_2O$ 0.25, $MgSO_4$. $7H_2O$ 0.50, K_2HPO_4 1.0, $NaHCO_3$ 10.0, NaCl 2.0, resazurin 4.0) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เชื้อจะอยู่ในระยะ log phase โดยมีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง 10^5-10^6 CFUต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *E. coli*, *S. aureus* และ *Sal.* Typhi เลี้ยงในอาหาร MHB เป็นเวลา 15 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีจำนวนเชื้อ 10^8 10^9 และ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดลองทำได้โดยเติม *B. bifidum* ลงในอาหาร minimal medium ให้มีปริมาณสุดท้ายประมาณ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตรแล้วเติมแบคทีเรียก่อโรคให้มีปริมาณสุดท้าย 10^4 CFUต่อมิลลิลิตร โดยที่ในอาหารใช้ EPSs ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับกลูโคส โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น ชุดที่เลี้ยง *B. bifidum* เดี่ยวๆ ในอาหารที่เติม EPSs ชุดที่เลี้ยง *B. bifidum* ร่วมกันกับแบคทีเรียก่อโรค ชุดที่เลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคเดี่ยวๆ และชุดที่เลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในขวดสุญญากาศที่ พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน และเติม L-cystein เพื่อให้เป็นสภาวะไร้อากาศ โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาตรวจติดตามการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยนำมา spread plate บนอาหาร MHA นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วรายงานผลเป็น CFUต่อมิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรียก่อโรคและใช้การนับโดยตรงโดยการใช้ Hemacytometer สำหรับ *B. bifidum* และรายงานผลเป็น Log cellต่อมิลลิลิตร(ดัดแปลงจาก Fook and Gibson, 2003)

2.3.2 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของ EPSs

ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียและรา ได้แก่ *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, *Stap. Aureus*, *A. fumigatus* และ *C. albicans* โดยวิธี broth microdilution assay ในถาดหลุมแบบ 96 หลุม แต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วยสารละลาย EPSs ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดยเครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบสองเท่า (two –fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย, YM สำหรับยีสต์ และ PDB สำหรับรา ให้ได้ความเข้มข้นของ EPSs ในแต่ละหลุมเป็นร้อยละ 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 น้ำหนักต่อปริมาตร เติมสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์โดยเจือจางเชื้อในระยะ log phase (15 ชั่วโมง) สำหรับ *Stap. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli* O157: H7 ทำ spore suspension สำหรับ *A. fumigatus* และนับเซลล์สำหรับ

C. albicans (ภาคผนวก ข) ใช้เชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรซึ่งทำให้มีความเข้มข้นของจุลินทรีย์สุดท้ายเป็น 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของ EPSs เท่ากับร้อยละ 5, 2.5 1.25 และ 0.625 น้ำหนักต่อปริมาตรมีชุดควบคุม ที่เป็น positive control ซึ่งไม่เติม EPSs และ negative control ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ บ่มถาดหลุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงแล้วอ่านค่าความเข้มข้นของหลุมที่มีความขุ่นเท่ากับหลุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งถือว่ามีการยับยั้งเกิดขึ้นโดย แสดงเป็นค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ EPSs ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราและยีสต์ที่ 48 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Lorian, 1980)

2.4 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ EPSs

2.4.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุล

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (กรุงเทพมหานคร) ด้วยวิธี Gel permeation chromatography (GPC)ซึ่งทำได้โดยนำ EPSs มาละลายใน 0.1 M $NaNO_3$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อปริมาตรแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองที่ทำด้วยไนลอนก่อนฉีดเข้าเครื่อง GPC (Polymer laboratories, England) โดยใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel linear (Water, USA)โดยฉีดเข้าปริมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เครื่อง Detector เป็น RI detector ใช้ pullulans เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุล (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ผลโดยใช้ PL Logical GPC software (England)

2.4.2 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

ทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยนำ EPSs มาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 1 เติม Trifluoroacetic acid (TFA) ความเข้มข้น 2 M ในอัตราส่วนระหว่าง สารละลาย EPSs และสารสะลาย TFA เป็น 1:1 ย่อยโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหยดบนแผ่น TLC ชนิด normal phase ปริมาณ 0.05 ไมโครลิตร โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ฟลุคโตส และ แรมโนสในปริมาตรที่เท่ากัน นำแผ่น TLC แช่ใน TLC chamber ซึ่งมีระบบของตัวทำละลายเป็นอัตราส่วนของเอทิลอะซิเตต:ไอโซโพรพานอล:น้ำ เป็น 3:3:1 ตามลำดับรอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนดไว้นำมาเป่าให้แห้ง หลังจากนั้นพ่นด้วยสารผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริก:เมทานอล อัตราส่วน 1:3 วางไว้จนแห้งและนำมาตรวจสอบการเกิดสีด้วยความร้อนโดยนำมาวางบน hot plate จนเห็นจุดสี

ของน้ำตาลบนแผ่น TLC วัดระยะที่น้ำตาลและตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้แล้วคำนวณหาค่า R_f เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ (ดัดแปลงจาก Yang *et.al*., 2004)