

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากราเอนโดไฟต์ของมะยม

Antioxidation activity of endophytic fungi
from *Phyllanthus acidus* fruit



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากราเอนโดไฟต์ของมะยม

Antioxidation activity of endophytic fungi
from *Phyllanthus acidus* fruit



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIOXIDATION ACTIVITY OF ENDOPHYTIC
FUNGI FROM *PHYLLANTHUS ACIDUS*



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF
SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากราเอนโดไฟต์ของมะยม
Antioxidation activity of endophytic fungi
from *Phyllanthus acidus*

ชื่อนักศึกษา

นางสาวธัญวรรณ์ กั้นเสน รหัสนักศึกษา 56050846

นายนิธิฤทธิ กำลังเกื้อ รหัสนักศึกษา 56050854

นางสาวบุญญารัตน์ รัตน์ะ รหัสนักศึกษา 56050856

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ธนาวดี ก่ออานันต์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้สนใจว่าการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะยมสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้จำนวน 3 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหารเหลวที่มีการเติมเกลือแร่ที่แตกต่างกัน 5 แบบ เป็นเวลา 5 วัน ไอโซเลตที่เจริญในอาหารที่เติมเกลือแคลเซียมคาร์บอเนตมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ประมาณ 82.75 กรัม นำสารสกัดของเซลล์ที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก พบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์สามารถดักจับอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH ได้ สูงมีค่าประมาณ 6.57-82.75% โดยพบว่าไอโซเลต 1 ที่เจริญในอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าสูงสุด โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH สูงสุดมีค่าประมาณ 82.75% ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกสูงทั้งหมด 1,455.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากแคลเซียมไอออนที่มีการเติมจะช่วยให้การส่งสัญญาณของเซลล์และช่วยเพิ่มการนำไฟฟ้าของโปตัสเซียมที่ทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติกและการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งต้องมีการศึกษาให้แน่ชัดต่อไป

คำสำคัญ : มะยม, เอนโดไฟต์, การส่งสัญญาณของเซลล์

| | | | |
|---------------|--|-------------|---------------------|
| Title | Antioxdation activity of Endophytic fungal from <i>Phyllanthus acidus</i> | | |
| Students | Miss Thunwarat | Kunsen | Student ID 56050846 |
| | Mr. Nithirit | Kamlangkuea | Student ID 56050854 |
| | Miss Boonyarat | Rattana | Student ID 56050856 |
| Degree | Bachelor of Science | | |
| Major Program | Technology | | |
| Faculty | Science | | |
| University | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) | | |
| Academic Year | 2016 | | |
| Advisor | Thanavadee Kor-arnan | | |

Abstracts

This study interested to evaluate an antioxdation activity of bacteria which were isolated from *Phyllanthus acidus* fruit. Isolated bacteria were cultivated in shake flask (200 rpm) supplement with mineral salts e.g. CaCO_3 , CaCl_2 , Na_2CO_3 and NaCl at 0.5 g/L for 5 days. It was found that, Ca^{2+} improved fungal growth and Na^+ improved the metabolites production. The extracellular metabolites extraction with 95% EtOH using ultrasonication has higher DPPH scavenging and has higher total phenolics content. Extracellular metabolites from isolated 1 has DPPH scavenging activity about $82.75 \pm 0.35\%$ and has TPC $2,303.24 \pm 22.97$ ug/mg. Ca^{2+} supplement can increase cell growth that may relate the increasing polarization of membrane and increasing cell signaling which will be study in the next future.

Keywords : *Phyllanthus acidus*, endophytes, cell messenger

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ธนาวัต ก่ออานันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดและเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา แนะนำในทุกขั้นตอนการทดลอง ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น รวมทั้งคณะกรรมการโครงการพิเศษ ดร.กานต์ วงศาริยะ และดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่น ๆ ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ และช่วยเหลือคณะผู้จัดทำในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ในการให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการเบิก และคืนสารเคมี ตลอดจนอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆในการทดลอง คอยอำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำในระหว่างการปฏิบัติงาน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ดูแลอาคาร คุณป้าแม่บ้านที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ผู้มีพระคุณและผู้เกี่ยวข้องอื่น ๆ รวมทั้งเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาของการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ผู้วิจัยหวังว่า โครงการพิเศษฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่อาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนทำให้ผลงานที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และขอมอบความกตัญญูตเวทิตาคุณแด่บิดามารดาและผู้มีพระคุณทุกท่านสำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียวและยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษาเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

| | |
|------------|------------|
| ธัญวรัตน์ | กันแสน |
| นิธิฤทธิ | กำลังเกื้อ |
| บุญญารัตน์ | รัตนะ |

สารบัญ

| เรื่อง | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อ | ก |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ..... | ง |
| สารบัญตาราง | ช |
| สารบัญรูป | ฉ |
| คำย่อ/สัญลักษณ์ | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 1 |
| 1.3 ขอบเขตการศึกษา | 1 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| 2.1 มะยมและลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... | 3 |
| 2.2 รา (Mold)..... | 3 |
| 2.2.1 สารอาหารของรา..... | 3 |
| 2.2.2 ธาตุอาหารของรา..... | 4 |
| 2.2.3 การได้รับสารอาหารของรา..... | 4 |
| 2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของรา | 5 |
| 2.3 ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi)..... | 6 |
| 2.4 สารต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อรา | 6 |
| 2.5 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ | 6 |
| 2.5.1 อนุมูลอิสระ (Free Radical)..... | 6 |
| 2.5.2 สารประกอบฟีนอลิก..... | 7 |
| 2.5.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ | 8 |
| 2.5.4 วิเคราะห์ปริมาณวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin Ciocalteu reagent..... | 9 |
| 2.5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay | 9 |
| 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 10 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย | 12 |
| 3.1 วัตถุประสงค์ | 12 |
| 3.2 อุปกรณ์ | 12 |
| 3.3 สารเคมี | 13 |
| 3.4 วิธีการทดลอง | 13 |
| 3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง | 13 |
| 3.4.2 การแยกราเอนโดไฟต์ออกจากมยะยม | 14 |
| 3.4.3 การจำแนกคุณลักษณะของราเอนโดไฟต์ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะ สัญญาณ | 14 |
| 3.4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ | 14 |
| 3.4.5 การสกัดสารจากราเอนโดไฟต์ | 15 |
| 3.4.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ | 15 |
| 3.4.7 ศึกษาเกลือแร่เสริมในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้าน อนุมูลอิสระของราเอนโดไฟต์ | 16 |
| 3.4.8 การเก็บรักษาเชื้อราด้วยซิลิกาเจล | 17 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล | 18 |
| 4.1 การคัดแยกเชื้อราและการทำให้บริสุทธิ์ | 18 |
| 4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ | 18 |
| 4.2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของราบนผิวหน้าอาหารแข็ง PDA | 18 |
| 4.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ | 20 |
| 4.2.3 การศึกษาคุณลักษณะราเอนโดไฟต์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี | 21 |
| 4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ | 22 |
| 4.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ | 22 |
| 4.3.2 ศึกษาเกลือแร่เสริมในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ | 24 |
| 4.4 การเก็บรักษาด้วยซิลิกาเจล | 28 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 30 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย | 30 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 31 |
| ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ | 33 |

สารบัญ(ต่อ)

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| ภาคผนวก ข การเตรียมตัวอย่างและสารเคมี | 34 |
| ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์ | 35 |
| ภาคผนวก ง ข้อมูลผลการทดลอง..... | 40 |
| ภาคผนวก จ ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ..... | 50 |
| เอกสารอ้างอิง | 94 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 2.1 ฤทธิ์ยับยั้งลึปิดเพอร์ออกซิเดชันและลดการการตายของเซลล์จากภาวะถูกออกซิไดซ์...7 | |
| ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟต์ที่มีการผลิตกรดบนอาหาร Potato dextrose Agar (PDA) และ Potato dextrose Broth (PDB) ที่มีการผสมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple | 21 |
| ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อราที่นำมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่สภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ($p < 0.01$)..... | 22 |
| ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักสารสกัดเมตาบอไลต์จากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลี้ยงในสภาวะที่ต่างกัน ($p < 0.01$)..... | 23 |
| ตารางที่ 4.4 ตารางผลของการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ($p < 0.01$)..... | 23 |
| ตารางที่ 4.5 ตารางผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ($p < 0.01$)..... | 24 |
| ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งของราที่นำมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่มีการเติมเกลือแร่เสริมที่แตกต่างกัน ($p < 0.01$)..... | 24 |
| ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักเมตาบอไลต์จากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน ($p < 0.01$)..... | 25 |
| ตารางที่ 4.8 ตารางผลของค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)..... | 26 |
| ตารางที่ 4.9 ตารางผลของค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)..... | 26 |
| ตารางที่ 4.10 ตารางผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)..... | 27 |

สารบัญตาราง(ต่อ)

| เรื่อง | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 4.11 ตารางผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p \leq 0.01$)..... | 27 |
| ตารางที่ 1ง ผลการคำนวณ DPPH ของ Extracellular..... | 40 |
| ตารางที่ 2ง ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ | 42 |
| ตารางที่ 3ง ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ | 44 |
| ตารางที่ 4ง ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ | 47 |



สารบัญรูป

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 2.1 ลักษณะของผลมะยม | 3 |
| รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ DPPH..... | 10 |
| รูปที่ 4.1 แสดงรูปร่างของโคโลนีเชื้อรา ไอโซเลต1 | 18 |
| รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างของโคโลนีเชื้อรา ไอโซเลต2 | 19 |
| รูปที่ 4.3 แสดงรูปร่างของโคโลนีเชื้อรา ไอโซเลต3 | 19 |
| รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต1 จากกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า | 20 |
| รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต2 จากกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า | 20 |
| รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต3 จากกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า | 21 |
| รูปที่ 4.7 แสดงผลการเก็บรักษาเชื้อราในซิลิกาเจลเจลดของทั้ง 3 ไอโซเลต | 29 |
| รูปที่ 1ค รูปการแสดงผลการเปลี่ยนแปลงในสีของอาหาร PDB ที่มีการเติมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple | 35 |
| รูปที่ 2ค เพลทที่ใช้ในการยืนยันผลว่าในหลอดทดลองว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นนอกจาก ราที่ต้องการทดสอบจากการสังเกตด้วยตาเปล่า | 36 |
| รูปที่ 3ค แสดงการเปลี่ยนแปลงในสีของอาหาร PDA ที่มีการเติมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple | 37 |

คำย่อ/สัญลักษณ์

| คำย่อ | ความหมาย |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| รวมเกลือ | เต็มเกลือแร่ทั้งหมด |
| % | เปอร์เซ็นต์ |
| CaCO ₃ | แคลเซียมคาร์บอเนต |
| CaCl ₂ | แคลเซียมคลอไรด์ |
| DPPH | 2,2- diphenyl -1 – picrylhydrazyl |
| E 1 | ไอโซเลต1 |
| E 2 | ไอโซเลต2 |
| E 3 | ไอโซเลต3 |
| Na ₂ CO ₃ | โซเดียมคาร์บอเนต |
| NaCl | โซเดียมคลอไรด์ |
| PDA | Potato dextrose ager |
| PDB | Potato dextrose broth |
| ug/mg | ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา ญ่ ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) เป็นราเอนโดไฟต์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืช จะพบเอนโดไฟต์ที่เป็นราได้ในพืชหลายชนิด ได้แก่ มะขามป้อม, มะยม และลูกใต้ใบ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูล Phyllanthaceae มีทั้ง ไม้ล้มลุก, ไม้พุ่ม, ไม้ยืนต้น, ไม้เลื้อยและไม้น้ำ (Gramineae) การศึกษานี้ได้สนใจที่ศึกษาเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นมะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) ที่เป็นเชื้อรา เนื่องจากมีรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นมะยม ว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ โรคทางระบบประสาท โรคตับ และการต้านการอักเสบ เป็นต้น

ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากเอนโดไฟต์ที่เป็นเชื้อราจากต้นมะยม ทั้งที่ต้นมะยมเป็นผลไม้พื้นบ้านของไทยมาตั้งแต่โบราณ และยังไม่มีการใช้ประโยชน์จากต้นมะยมทางด้านเภสัชกรรมได้มากเท่าที่ควร งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นมะยมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ที่คาดหวังว่ามะยมน่าจะเป็นแหล่งของสารเมตาบอไลต์แปลกใหม่ที่น่าสนใจและหาได้ง่ายในท้องถิ่น ซึ่งอาจมีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกราเอนโดไฟต์ที่เจริญได้ในผลมะยมให้บริสุทธิ์
- 1.2.2 เพื่อจำแนกคุณลักษณะของราเอนโดไฟต์โดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมีของราแต่ละชนิด
- 1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดของเกลือแร่ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด
- 1.2.4 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ได้จากมะยม
- 1.2.5 เพื่อศึกษาการเก็บรักษาเชื้อราเอนโดไฟต์เป็นระยะเวลานาน ได้อย่างเหมาะสม

1.3 ขอบเขตการศึกษา

นำตัวอย่างของผลมะยม มาทำความสะอาดเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนพื้นผิว ก่อนทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์ จำแนกลักษณะของเชื้อราเบื้องต้น นำราที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากราเอนโดไฟต์ พร้อมทั้งหาสภาวะและปรับปรุงสูตรอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟต์เพื่อให้ผลิตเชื้อราเอนโดไฟต์และสารต้านอนุมูลอิสระให้ได้มากที่สุด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้ราเอาโนไฟต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เจริญได้ในผลของมะยม
- 1.4.2 ทราบเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอาโนไฟต์จากมะยม
- 1.4.3 ได้ราเอาโนไฟต์ที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระสูง
- 1.4.4 ส่งเสริมการใช้ประโยชน์ของราเอาโนไฟต์จากมะยม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะยมและลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อสามัญ : Star gooseberry

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels

วงศ์ : EUPHORBIACEAE

ชื่ออื่น : หมากยม (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) และยม (ภาคใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ยืนต้นสูง 3-10 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับกันเป็น 2 แถว แต่ละก้านมีใบย่อย 20-30 คู่ ใบรูปไข่หรือรูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 3.5-8 เซนติเมตร ดอกช่อ ออกที่ซอกใบหรือกิ่งก้าน แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน กลีบดอกสีแดง ผลสดรูปกลมแบนมี 6-8 พู เมื่อสุกสีเหลืองอ่อน มีรสเปรี้ยวเหลืองหรือสีแดง เนื้อในสีเหลืองหรือส้มฉ่ำน้ำ รับประทานได้มีถิ่นกำเนิดในอินเดีย ก่อนที่จะกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของผลมะยม

2.2 รา (Mold)

รามีลักษณะทั่วไปแตกต่างจากยีสต์โดยรามีลักษณะเป็นเส้นใยมากกว่ายีสต์ เส้นใยราเกิดจากเซลล์หลายเซลล์ต่อกัน หรืออาจติดต่อกันตลอดเป็นเซลล์เดียวขนาดยาวมากก็ได้เชื้อราได้รับสารอาหารโดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โพลีแซคไรด์ ให้เป็นมอนแซคคาไรด์และย่อยโปรตีน ให้เป็นกรดอะมิโน แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์หรือเส้นใย ราส่วนใหญ่ดำรงชีพแบบทั้งที่เป็นอิสระหรือเป็นผู้ย่อยสลายซากอินทรีย์ (saprophyte) บางชนิดเป็นปรสิต (parasite) และบางชนิดสามารถดำรงชีวิตโดยเป็นได้ทั้ง parasite และ saprophyte ราเติบโตในภาวะที่มีอากาศเท่านั้น (obligate aerobes) จึงพบเจริญเติบโตบริเวณผิวหน้าของอาหารรวมถึงเจริญบนสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ซากพืช ซากสัตว์หรือพืช และสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่

2.2.1 สารอาหารของรา

อาหารของรามีหลายชนิดกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและ พลังงานที่ดีสำหรับราทุกชนิด น้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ซูโครสและมอลโทส รวมทั้งสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์อื่นๆ เช่น แป้ง (starch) และเซลลูโลสนั้น มีราหลายชนิดสามารถใช้ได้ เช่น สารอนินทรีย์ไนโตรเจน อยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม หรือ ไนเตรท ราบางชนิดสามารถใช้ได้แต่บางชนิดต้องการ ไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น เพปไทด์ เกลือแร่ต่างๆ ซึ่งจำเป็นต่อการเติบโต และมีราบางชนิดที่ต้องการวิตามิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ธาตุอาหารของรา

ที่อยู่ในรูปเกลือที่นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงรามีหลายชนิด ได้แก่

- แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) เป็นสารประกอบมีสูตรเคมี คือ CaCO_3 แคลเซียมคาร์บอเนต ไม่ละลายในน้ำ แต่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์แล้วกลายเป็นแคลเซียมไบคาร์บอเนต (ซึ่งมีสูตรเคมีคือ $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) แคลเซียมไบคาร์บอเนตละลายในน้ำได้เล็กน้อย
- แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) เป็นสารประกอบมีสูตรเคมี คือ CaCl_2 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ใช้มากในงานอุตสาหกรรมทั่วไป อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเกษตร เป็นสารที่ดูดซับความชื้น และละลายได้ดีในน้ำ เมื่อละลายน้ำจะเกิดกรดไฮโดรคลอริก และเกิดแคลเซียมประจุบวก มักใช้ในรูป $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ หรือ $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- โซเดียมคาร์บอเนต หรือโซดาแอส (Sodium carbonate หรือ Soda ash) สูตรเคมี คือ Na_2CO_3 เป็นสารประกอบเกลือของกรดคาร์บอนิก มีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น สามารถดูดความชื้นจากอากาศได้ดี ละลายได้ในน้ำ มีฤทธิ์เป็นด่างเมื่อละลายน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) สูตรเคมี คือ NaCl มีชื่อที่เรียกทั่วไปตั้งนี้เกลือแกง หรือฮาไลต์ เป็นสารประกอบเคมี โซเดียมคลอไรด์เป็นเกลือที่มีบทบาทต่อความเค็มของมหาสมุทร และของเหลวภายนอกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ละลายน้ำได้ดี

2.2.3 การได้รับสารอาหารของรา

รามีการดูดซึมสารอาหารผ่านพลาสมาเมมเบรน สารที่ถูกดูดซึมได้ต้องมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและละลายน้ำได้ สารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้เชื้อราจะมีสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง

- การย่อยสลายสารอาหารภายนอกเซลล์ สารที่มีโมเลกุลเล็กๆ เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโนสามารถละลายน้ำได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เซลลูโลส แป้งและโปรตีน ส่วนมากจะถูกย่อยสลายก่อนที่จะนำไปใช้
- การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ ไอออนทั้งหมดและโมเลกุลของสารอาหารผ่านเข้าไปในเซลล์ของราได้โดยผ่านพลาสมาเมมเบรน ที่มีรูพรุนและยอมให้อิออนหรือโมเลกุลของสารผ่านได้ พลาสมาเมมเบรนเป็นเยื่อเลือกผ่านอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นที่เรียกว่า free diffusion พบในการแพร่ของกรดอินทรีย์ อัลเคนสายสั้นๆ กรดไขมันสายยาวและก๊าซต่าง ๆ เป็นต้น ส่วนการนำสารเข้าสู่เซลล์แบบ facilitated diffusion จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์พอร์มิเอส สารจะแพร่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ กระทั่งความเข้มข้นภายในเซลล์เท่ากับความเข้มข้นภายนอกเซลล์ เช่น การแพร่ของกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแพร่แบบ diffusion channel จะแพร่จากบริเวณที่เข้มข้นเบรรมมีประจุลบกระทั้งเมมเบรรมมีประจุบวก เช่น การแพร่ของโปรตีนเชื่อมอออน และลักษณะการแพร่แบบสุดท้ายเรียกว่า active transport ที่มีการใช้เอนไซม์ H^+ ATPase และมีการใช้พลังงาน ATP ทำให้เกิดการแพร่ของโปรตอนแบบ symport หรือมีการแพร่ของโปรตอนแบบ antiport เช่น การแพร่ของน้ำตาล, กรดอะมิโนและอออนต่าง ๆ

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของรา

สปอร์ทำหน้าที่สำคัญคือ เป็นหน่วยแพร่กระจายและเพื่อการอยู่รอด ราแต่ละชนิดส่วนใหญ่สร้างสปอร์ได้มากกว่า 1 แบบ ลักษณะของสปอร์เพื่อการแพร่กระจายต้องแยก ออกจากเส้นใยได้ง่ายและจะมีกลไกพิเศษในการแยกตัว มีการสร้างเป็นจำนวนมากแต่มีขนาดเล็ก มีชีวิตอยู่ได้ไม่นานสามารถงอกได้ทันทีเมื่อตกลงในที่ที่มีอาหารและรูปร่างหลากหลาย ส่วนลักษณะของสปอร์เพื่อการอยู่รอดมักติดแน่นอยู่กับเส้นใยแม่ มีการสร้างจำนวนไม่มากแต่มีขนาดค่อนข้างใหญ่สามารถอยู่รอดได้ดี ผนังค่อนข้างหนา มีรูปร่างหลากหลาย ราหยุดการเจริญเติบโตเมื่ออาหารเหลือน้อยลง เพื่อการอยู่รอดราต้องสามารถแพร่กระจายไปยังที่ใหม่ที่มีอาหารมากกว่า ปริมาณอาหารที่น้อยลงจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมักจะไม่เหมือนกับสภาพที่ราจะสร้างสปอร์

- ระบบอาหาร เมื่อเลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าของอาหารแข็ง เชื้อจะเจริญเป็นวงกลม เป็นรัศมี มีบริเวณรอบนอกหรือขอบ (extension zone) แล้วสร้างสปอร์หรือฟรุตติงบอดี (fruiting bodies) ส่วนการเลี้ยงราในอาหารเหลว ส่วนใหญ่ราทั่วไปเจริญอยู่เฉพาะที่ผิวหน้าอาหารของอาหารเหลวที่ไม่มีการ กวน เหมาะในการศึกษากระบวนการสร้างสปอร์ส่วนอาหารเหลวที่มีการกวนเชื้อจะเจริญจมอยู่ใน
- ระดับอาหาร มีผลต่อการสร้างสปอร์ที่ 3 ระยะใหญ่ด้วยกันคือ ระยะ เจริญเติบโต (vegetative growth) ระยะเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ (induction of sporulation) และระยะสร้างสปอร์สมบูรณ์ (completion of sporulation) ราที่มีฟรุตติงบอดีขนาดใหญ่ต้องการเส้นใยจำนวนมากจึงต้องการอาหารในช่วงแรกมากกว่าปกติ เมตาบอลิซึมอาจส่งผลให้เกิดการ สะสมอนุมูลกรต หรืออนุมูลเกลือแล้วไปมีผลเป็นพิษกับราเอง ทำให้สภาพไม่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ อาหารที่มีความเข้มข้นน้อยหรืออาหารที่ย่อยยาก เช่น แป้งอาจกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสะสมอาหาร เช่น ไกลโคเจนกระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ได้ในระยะเหนี่ยวนำ ให้สร้างสปอร์ในราเกือบทุกชนิด เมื่อไนโตรเจนในอาหารเหลือน้อยลงเป็นปัจจัยสำคัญ ที่เป็นตัวกระตุ้น ให้มีการสร้างสปอร์แต่ถ้าขาดธาตุคาร์บอนด้วยราจะย่อยสลายตัวเอง และที่ระยะสร้างสปอร์โตสมบูรณ์ระหว่างที่มีการสร้างสปอร์จะมีการเปลี่ยนแปลงสารสังเคราะห์ภายในรา เนื่องจากสปอร์แตกต่างจากเส้นใย และองค์ประกอบ ของรา

2.3 ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi)

ราเอนโดไฟต์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชเจ้าบ้าน (host) ในลักษณะที่สิ่งมีชีวิตทั้งสองประเภทต่างพึ่งพาอาศัยกันที่ เรียกว่า ภาวะพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืชเจ้าบ้านเป็นแบบภาวะพึ่งพากันแบบ mutualism โดยที่พืชเจ้าบ้านที่ราเอนโดไฟต์อาศัยร่วมอยู่ด้วยนั้นจะให้สารอาหารและที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมกับราเอนโดไฟต์ ส่วนราเอนโดไฟต์ก็จะสร้างสารเมตาโบไลต์ ที่ช่วยปกป้องพืชเจ้าบ้านไม่ให้ได้รับอันตรายจากแมลง โรค และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ราเอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช (intercellular space) โดยจะมีการสร้างเส้นใยแทรกเข้าไปบริเวณช่องว่างในชั้นเนื้อเยื่อของพืชเจ้าบ้านที่เชื้อรานั้นอาศัยอยู่ด้วยโดยที่ราเอนโดไฟต์ไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรค ราเอนโดไฟต์สามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนที่อยู่เหนือดินของพืชเจ้าบ้านและสามารถถ่ายทอดภาวะการดำรงชีพแบบนี้ได้จากการถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งได้โดยการแทงเส้นใยเข้าไปในส่วนของรังไข่ที่เจริญเป็นเมล็ด (ovule) เมื่อเมล็ดพืชนั้นงอกและเจริญเป็นต้นอ่อน เชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในก็เจริญเติบโตไปพร้อมกันด้วย ภาวะการอยู่อาศัยระหว่างราเอนโดไฟต์และพืชเจ้าบ้านอาจมีได้หลายแบบ เช่น ราเอนโดไฟต์แบบแท้จริง (true endophyte) มีการอาศัยอยู่ร่วมกันของราเอนโดไฟต์ในต้นพืชเจ้าบ้านตลอดช่วงอายุของเชื้อรานั้น โดยที่ไม่ทำอันตรายกับพืชเจ้าบ้านที่เชื้อรานั้นอาศัยอยู่ด้วยเลย อีกกลุ่มหนึ่งคือ ราเอนโดไฟต์แบบก่อโรคระยะแฝง (latent pathogen) เป็นราเอนโดไฟต์ที่เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคพืช แต่เชื้อราก่อโรสดังกล่าวมีช่วงชีวิตระยะแฝงอยู่กับพืชเจ้าบ้านและไม่แสดงลักษณะของการเกิดโรคในพืชนั้น ส่วนกลุ่มสุดท้ายคือ ราเอนโดไฟต์แบบผู้ย่อยสลายระยะแฝง (dormant saprophyte) เป็นกลุ่มเชื้อราผู้ย่อยสลายที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสดและไม่ทำอันตรายต่อพืชอาศัย แต่เมื่อเนื้อเยื่อพืชแก่และตายไปแล้ว เช่น ใบไม้ร่วงหล่น ราเอนโดไฟต์ที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชจะเข้าครอบครองซากพืชเป็นกลุ่มแรกเพื่อย่อยสลายซากพืชนั้นก่อนจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลายอื่น

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อรา

เราสามารถเป็นแหล่งในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น *Aspergillus fumigatus*, *Cordyceps sinensis* และเห็ดอีกหลายชนิด

2.5 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

2.5.1 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูล หรือสารต้านอนุมูลอิสระ คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง รวมถึงอะตอมของไฮโดรเจน และไอออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน แต่ละอิเล็กตรอนนั้นแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

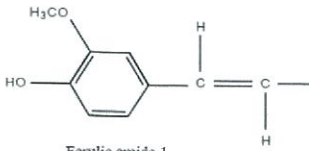
ที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลหรืออนุมูลอิสระคืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูลอิสระ A^{\cdot} อนุมูล A^{\cdot} และอนุมูล $A^{+\cdot}$ โดยเฉพาะอนุมูลอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่อิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ทำให้อนุมูลอิสระมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น อย่างไรก็ตามยังมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่วิในการเกิดปฏิกิริยา สามารถคงอยู่ในสภาวะอนุมูลอิสระได้นาน ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) ไฮดรอกซี ($\cdot OH$) อัลคอกซี (RO^{\cdot}) และเปอร์ไฮดรอกซี (HO_2^{\cdot}) เป็นต้น

สารกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenger) สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ ทำให้อนุมูลอิสระหมดไปหรืออนุมูลอิสระหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมีหลายชนิด เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน วิตามินซี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน

2.5.2 สารประกอบฟีนอลิก

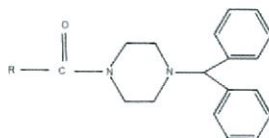
สารประกอบฟีนอลิก ส่วนมากสามารถสารต้านอนุมูลได้ พบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก, ผลไม้, ชาเขียว, ชาดำ, ซ็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโพรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น ปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม ถึง 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ได้รับต่อวัน และสารฟีนอลิกยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ ช่วยสลายลิมโฟไซต์และยับยั้งมะเร็ง โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกส์ และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ และฟีนอลิกเป็น secondary metabolites

ตารางที่ 2.1 ฤทธิ์ยับยั้งลิปิดเพอร์ออกซิเดชันและลดการการตายของเซลล์จากภาวะถูกออกซิไดซ์

| R | IC ₅₀ (μM) | % Survival | | Log P |
|--|---------------------------------|-------------|-----------|-------|
| | | 0.1 μM | 1 μM | |
|  Ferulic amide 1 | 19.92 | 47.21** | 50.88*** | 3.86 |

เซลล์ NG108-5 ได้รับการทดสอบ 1.5 ชม. ก่อนทำให้เซลล์ตายก่อนสภาวะถูกออกซิไดซ์ (Oxidative stress) ด้วย 30 mM H_2O_2 หลังจากนั้นหาจำนวนเซลล์รอดชีวิต

ตารางที่ 2.1(ต่อ)ฤทธิ์ยับยั้งลิปิดเพอร์ออกซิเดชันและลดการการตายของเซลล์จากภาวะถูกออกซิไดซ์



| R | IC50 (μM) | % Survival | | Log P |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------|-------|
| | | 0.1 μM | 1 μM | |
| <p>Anillic amide 2</p> | 190.54 | 32.23* | 32.63* | 2.87 |
| <p>Homovanillic amide 3</p> | 48.47 | 40.36 | 40.02* | 3.23 |
| <p>Syringic amide 4</p> | 26.66 | 35.08 | 42.33* | 2.25 |
| Trolox | 51.14 | 29.42 | 34.64* | 2.35 |
| Curcumin | 5.23 | 39.64 | 47.03* | 2.49 |

เซลล์ NG108-5 ได้รับการทดสอบ 1.5 ชม. ก่อนทำให้เซลล์ตายก่อนสภาวะถูกออกซิไดซ์ (Oxidative stress) ด้วย 30 mM H₂O₂ หลังจากนั้นหาจำนวนเซลล์รอดชีวิต

2.5.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

- **ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)** สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เพื่อทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น

- **ยับยั้งการทำงานของซิงเกิลท์ออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, 1O₂^{*})** สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกิลท์ออกซิเจนโดยการเปลี่ยน (1O₂^{*}) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen (3O₂) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อนโดยที่แคโรทีนอยด์จำนวน 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับ Singlet oxygen ได้ถึง 1,000 โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) สารกลุ่มนี้ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ฟอสฟอริกแอซิด (phosphoric acid) และซิตริกแอซิด (citric acid) เป็นต้น โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+}

- หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) วิตามินอี สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy (ROO^{\cdot})

- เสริมฤทธิ์ (synergism) สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α -tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid)

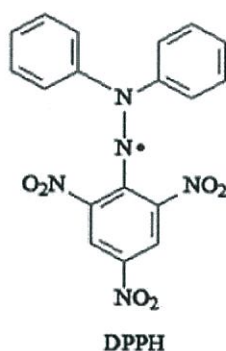
- ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งในปฏิกิริยาที่มีโลหะไอออนจะเป็นการเร่งการสลายโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นการทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

2.5.4 วิเคราะห์ปริมาณวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin Ciocalteu reagent

สารละลาย Folin-Ciocalteu ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโมลิบดีนัมไอออน (Molybdotungstate ion) รีเอเจนต์ประกอบด้วย โซเดียมทังสเตต (Sodium tungstate) โซเดียมโพลิบเดต (Sodium polybdate) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ปฏิกิริยาจะมีการเปลี่ยนแปลงของไอออน Mo (VI) ที่มีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และรายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปของมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent, มิลลิกรัมต่อกรัม GAE) (POLSIRI 2015)

2.5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

อนุมูล DPPH $^{\cdot}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS $^{\cdot+}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำได้โดยการลดลงของสีของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ DPPH

ที่มา : <http://www.erp.mju.ac.th/openFile.aspx?id=MTY4ODkx>

สืบค้นวันที่ 8 มิถุนายน 2560

ต่อมามีการพัฒนาใช้ DPPH[•] ในการหาความสามารถในการต้านอนุมูล เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) โดยคำนวณจากสมการ

$$AE = 1 / EC_{50} T_{EC50}$$

EC_{50} = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH[•] เริ่มต้นลงได้ 50%

$$T_{EC50} = \text{เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลให้ได้ } EC_{50}$$

ข้อดีของวิธีนี้มีข้อดี คือ สะดวกรวดเร็ว นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH[•] มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถจัดอันดับอนุมูลที่ความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH[•] ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์ดี แต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาจับอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าปกติ (ไมตรี, 2555)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับสถานะที่เหมาะสมในการเจริญของรา *C. pseudomilitaris* เป็นเวลา 24 วัน พบว่าเชื้อราชนิดนี้จะเจริญได้ดีในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าได้ และมีปริมาณเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้ เนื่องจากการเขย่าจะช่วยเพิ่มการละลายของออกซิเจน และช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส (นฤมล, 2540) ปริมาณเกลือแร่มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง การใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ และโปแตสเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งเกลือแร่ความเข้มข้น 0.7 กรัมต่อลิตร พบว่าในสูตรอาหารที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งเกลือแร่ เห็ดแครงจะมีอัตราการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 7.37 เซนติเมตร และลักษณะของเส้นใยซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์ และโปแตสเซียมคลอไรด์เส้นใยจะมีสีขาวฟู โดยเฉพาะอย่างยิ่งเส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์เส้นใยมีสีขาวฟู เจริญได้มากกว่าสูตรอาหารอื่น (สุวิทย์, 2011) เส้นใยเห็ด *Phellinus lintius* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งเกลือแร่ จะมีการเจริญและสร้างเส้นใยได้ดีที่สุดเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์ที่เติมในสูตรอาหารทำให้เซลล์ต่อแรงดันออสโมติกได้ และช่วยกระตุ้นให้เซลล์สร้างโพลีเมอร์เพิ่มขึ้น (Hwang *et al.*, 2003)

การแยก *Botrytis cinerea* ที่ได้จากใบและลำต้นของมะเขือเทศบริเวณประเทศอัลจีเรีย ศึกษาผลของเกลือ NaCl และ CaCl_2 ความเข้มข้น 50 ถึง 150 ppm พบว่าการเติม NaCl ทำให้เส้นใยเจริญได้มากที่สุด การเติม CaCl_2 ความเข้มข้น 300 ppm จะยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนี้เกลือทั้งสองชนิดจะช่วยให้การสร้างโคโคไนด์ได้ดีที่ความเข้มข้นประมาณ 50 ppm และจะการสร้างจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 100 หรือ 300 ppm (Boumaaza *et al.*, 2015)

เกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการเจริญของไมโคไรซาที่เจริญบนต้นสนดำ (*Pinus thunbergii*) ของรา *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon rubescens* และ *Suillus luteus* พบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 25 mM ทำให้เซลล์เจริญได้ดีกว่าเมื่อทดสอบใช้เกลือความเข้มข้นระหว่าง 0–200 mM (Matsuda *et al.*, 2006) สารสกัดจากตัวทำลายเอทิลอะซิเตตของเอนโดไฟต์ที่เป็นราที่ได้จากต้นรัก (*Calotropis procera*), แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*), หน่ำรอก (*Euphorbia prostrata*), *Vernonia amygdalina* และ ลูกซัด (*Trigonella foenum-graecum*) พบว่าเอนโดไฟต์ *Aspergillus* sp. จากเมล็ดของลูกซัด (*Trigonella foenum-graecum*) มีสารฟีนอลิกสูงประมาณ $89.9 \pm .1$ มิลลิกรัม GAE/กรัม มีค่า IC_{50} การยับยั้งอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH ประมาณ 18.0 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (Khiralla *et al.*, 2015)

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดน่าน ประเทศไทย ซึ่งพบว่าการแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืชที่ปราศจากโรค ในป่าเต็งรัง 10 ชนิด เก็บตัวอย่างใบพืชในฤดูฝนและฤดูแล้ง ในปี พ.ศ. 2550 การจัดจำแนกชนิดราเอนโดไฟต์จะไดราเอนโดไฟต์ 19 สกุล ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันจากเชื้อราทั้งหมด 302 ไอโซเลต และยังพบว่า ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชในฤดูฝนมีจำนวนสูงกว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชในฤดูแล้ง โดยราเอนโดไฟต์ที่พบมากที่สุด 3 ชนิดแรก ได้แก่ *Phyllosticta* sp. (56 ไอโซเลต), *Phomopsis* sp. (50 ไอโซเลต) และ *Xylaria* sp. (46 ไอโซเลต) พบว่าราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *celomyces* มีจำนวนมากที่สุดตามด้วยกลุ่ม *ascomycetes* และ *hyphomycetes* จะพบน้อยที่สุดตามลำดับ ซึ่งคาดว่าจะไดราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในด้านอุตสาหกรรมและการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป (ธนวิช, 2553)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์

พื้นที่ใช้ในการทดลอง คือ มะยม พันธุ์เปรี้ยว เก็บที่คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, China)
- 3.2.2 กระบอกตวง
- 3.2.3 กรวยกรองแก้ว
- 3.2.4 โกร่งบดสาร
- 3.2.5 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS, Japan)
- 3.2.6 ขวดรีเอเจนต์
- 3.2.7 กระบอกวัดปริมาตร (Duran, Germany)
- 3.2.8 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 3.2.9 ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.2.10 ขวดใส่สารเคมี (Duran, Germany)
- 3.2.11 เข็มเย็บเชื้อ
- 3.2.12 เครื่องเขย่า (Oskon, U.S.A)
- 3.2.13 เครื่องชั่งสาร (OHAUS, U.S.A)
- 3.2.14 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (TOMY รุ่น ES-315, Japan)
- 3.2.15 เครื่องปั๊มสุญญากาศ (GE Motors, U.S.A)
- 3.2.16 เครื่องผสมสาร
- 3.2.17 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Heidolph, Germany)
- 3.2.18 เครื่องเหวี่ยงแยก (Falcon 6/300, U.K.)
- 3.2.19 เครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ รุ่น EZ READ 2000 (Biochrom, UK)
- 3.2.20 เครื่อง Ultrasonic bath (CREST, U.S.A)
- 3.2.21 จานกระดาษ
- 3.2.22 จานเพาะเชื้อ
- 3.2.23 ชุดกรองสุญญากาศบูชเนอร์ (HCT, Germany & PYREX®, U.S.A)
- 3.2.24 โถดูดความชื้น (DURAN® OHAUS, Germany)
- 3.2.25 ตู้เขี่ยเชื้อ (Holten Lamina, Denmark)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.26 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany)
- 3.2.27 ตู้อบลมร้อน (ConthermThermotec 2000, Germany)
- 3.2.28 ที่เจาะจุกคออร์ก
- 3.2.29 ปีกเกอร์ (PYREX®, Germany)
- 3.2.30 คีมคีบ
- 3.2.31 ปีเปต
- 3.2.32 พาราฟิล์ม
- 3.2.33 มีดผ่าตัด
- 3.2.34 ไมโครปีเปต (GILSON, France)
- 3.2.35 ไมโครเวลเพลท (Thermofisher, China)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 วิตามินซี (Ascorbic acid) (Fisher, UK)
- 3.3.2 แคลเซียมคาบอไรต์ (UNILAB, Australia)
- 3.3.3 แคลเซียมคลอไรด์ (UNILAB, Australia)
- 3.3.4 โซเดียมคาบอไรต์ (UNIVAR, Australia)
- 3.3.5 โซเดียมคลอไรด์ (UNIVAR, Australia)
- 3.3.6 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Kao, Thailand)
- 3.3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (SRL, India)
- 3.3.8 เอทานอล (RCL Labscan, Thailand)
- 3.3.9 Bromocresol purple (BDH, England)
- 3.3.10 folin-ciocalteu reagent (Sigma, USA)
- 3.3.11 Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) (SRL, India)
- 3.3.12 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, USA)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในกลุ่มของราเอนโดไฟต์ ซึ่งแยกได้จากผักและผลไม้ ได้แก่ มะยม โดยนำ ตัวอย่างผลมะยมที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่เป็นโรค มาล้างทำความสะอาดพื้นผิวนอก โดยการนำตัวอย่างมาแช่ในขวดเพาะเลี้ยงด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นตัวอย่างออกมาจากขวดวางบนจานกระดาษ ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหั่นมะยม ให้ได้ขนาด 1×1×1 เซนติเมตร นำตัวอย่างที่ตัดเป็นชิ้น มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยการนำ ตัวอย่างมาแช่ในขวดเพาะเลี้ยงด้วยเอทานอล เข้มข้น 70 % เป็นเวลา 1-2 นาที ย้ายมาแช่ แช่ในขวดที่มีสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 0.36 % เป็นเวลา 30 วินาทีและย้ายมาแช่ในขวด เพาะเลี้ยงที่มีน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาทีแช่ในน้ำกลั่นทั้งหมด 3 ชั่วโมง โดยนำน้ำกลั่นน้ำสุดท้าย ออกจากสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาทดสอบเชื้อที่ปนเปื้อนที่อาจหลงเหลืออยู่บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อใช้เป็นเพลทควบคุมและยืนยันว่าไม่มีการเจริญของเชื้อใด ๆ ปนเปื้อน ขั้นตอนทั้งหมดทำในตู้เขี่ยเชื้อที่มีสภาวะปลอดเชื้อเท่านั้น

3.4.2 การแยกราเอนโดไฟต์ออกจากมะยม

นำชิ้นตัวอย่างไปวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) วาง 3 ชิ้นไม่ให้ติดกัน และติดขอบจานเพาะเชื้อจนเกินไป จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่วางชิ้นตัวอย่างไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงจะเห็นว่ามีส่วนใยของราขึ้นบริเวณรอบๆ ชิ้นตัวอย่าง จากนั้นทำการขยายเชื้อโดยใช้ที่เจาะจุกคอรัคขนาด 0.7 เซนติเมตร ตัดบริเวณปลายเส้นในหรือขอบโคโลนี จากนั้นทำวันและเส้นใยที่ตัดด้วยที่เจาะจุกคอรัค ใช้เข็มเขี่ยเชื้อและปากคีบหยิบชิ้นมาวางบนอาหาร PDA บนจานเพาะเชื้อจานใหม่ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงจะเห็นว่ามีส่วนใยของราขึ้นบริเวณรอบ ๆ ชิ้นอาหารที่ตัดด้วยที่เจาะจุกคอรัค

3.4.3 การจำแนกคุณลักษณะของราเอนโดไฟต์ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะสัญญาณ

นำจานเพาะเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ ทำการศึกษาลักษณะสัญญาณ โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยบริเวณปลายเส้นใยบนจานเพาะเชื้อ นำมาวางบนสไลด์ที่มีการหยดสีแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำมาส่งอด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 และ 400 เท่า ถ่ายภาพและนำภาพที่ได้ไปเปรียบเทียบฐานข้อมูล และนำราเอนโดไฟต์ที่อยู่บนจานเพาะเชื้อมาทำการทดสอบด้านชีวเคมี โดยการเตรียมอาหาร PDB ในหลอดทดลองที่มีการเติมสาร Bromocresol Purple ลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้อาหาร PDB ที่เป็นสีม่วงซึ่งมีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 6.8 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยของราเอนโดไฟต์บนจานเพาะเชื้อลงในหลอดที่มีอาหารผสมอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงจะเห็นว่าอาการในหลอดทดลองจะมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อราเอนโดไฟต์มีการสร้างกรดซึ่งอาหารจะมีพีเอชประมาณ 5.2 ทำการบันทึกผล นำอาหาร PDB ที่ใช้ในการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ มีทำการลากเชื้ออาหาร PDA เพื่อเป็นการทดสอบว่าไม่มีเชื้อตัวอื่นปนเปื้อนและมาทำการสร้างกรดทำให้อาหาร PDB เปลี่ยนสี ทำการศึกษาเช่นเดียวกันนี้บนอาหาร PDA โดยการนำโคโลนีราและวันี่เจาะด้วยที่เจาะจุกคอรัค นำมาวางไว้บนอาหาร PDA ที่มีการเติม Bromocresol Purple เป็นอินดิเคเตอร์ จะได้อาหาร PDA ที่เป็นสีม่วงซึ่งมีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับค่าพีเอชให้ได้ประมาณ 6.8 หากการผลิตกรดจะเกิดเป็นสีเหลืองรอบ ๆ วงของวันี่และโคโลนีราที่เจาะด้วยที่เจาะจุกคอรัคที่วางไว้บนอาหาร PDA

3.4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาสภาวะทั้ง 2 สภาวะ ได้แก่ การเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวที่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลาและการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวที่ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง โดยการนำที่เจาะจุกคอรัค ขนาด 0.7 เซนติเมตรตัดบริเวณปลายเส้นในหรือขอบโคโลนี จากนั้นทำวันและเส้นใยที่ตัดด้วยที่เจาะจุกคอรัค ใช้เข็มเขี่ยเชื้อและปากคีบหยิบชิ้นมาใส่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร PDB ปริมาตร 200 มิลลิลิตรจำนวนเชื้อละ 3 ข้ำ จากนั้นแบ่งอาหาร PDB ที่มีการใส่เชื้อแล้วออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปทำการเขย่าในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีและอีกชุดนำไปตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สังเกตปริมาณเชื้อในขวดรูปชมพู่และนำอาหารและเชื้อไปกรองด้วยชุดกรองสุญญากาศบุชเนอร์ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารที่ติดอยู่บนกระดาษกรองไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ครบเวลานำออกมาใส่ไว้ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาทีจนน้ำหนักคงที่แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งแล้วนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างทั้ง 2 สภาวะ ได้แก่ การเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวที่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลาและการเลี้ยง ราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวที่ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมไปใช้ในการศึกษาต่อไป (เลือกที่สภาวะเขย่าเนื่องจากผลการทดลองมีปริมาณของน้ำหนักแห้งมากกว่า)

3.4.5 การสกัดสารจากราเอนโดไฟต์

ก. การสกัดสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์จากราเอนโดไฟต์

เตรียมน้ำเลี้ยงที่ได้จากการกรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ในขวดเก็บตัวอย่าง พันปากขวดด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข. การสกัดสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์จากราเอนโดไฟต์

เตรียมส่วนของเส้นใยที่ได้จากการกรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ที่นำไปอบแห้งแล้ว ชุดใส่โถรงบดสารบดให้ละเอียด จากนั้นนำผงราเอนโดไฟต์ที่ได้จากการบดใส่ขวดชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเอทานอลที่อัตราส่วน 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทำการแตกเซลล์ด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกรวยแก้วผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดที่ได้จากการระเหยไว้ในขวดเก็บสารปิดด้วยฝอย เจาะรูเล็กน้อยเพื่อให้ตัวทำละลายเอทานอลระเหยออกหมด เก็บขวดเก็บสารไว้ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ รววิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.4.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ก. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

- การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

- การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ (Extracellular Metabolite) ที่เป็นของเหลวทำการเจือจางเตรียมที่ความเข้มข้น 1 เท่า ส่วนสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ (Intracellular Metabolite) ที่เป็นของแข็ง เตรียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 95% ดูดสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 5 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์ เติมด้วยสารละลายละลาย folin-ciocalteau ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติมด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ข. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

- การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ในเอทานอล 95 %

- การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่เป็นของเหลวทำการเจือจางเตรียมที่ความเข้มข้น 1 เท่า ส่วนสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่เป็นของแข็ง เตรียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ดูดสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิว ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์ เติมสารละลาย DPPH ลงไป 200 ไมโครลิตร ทำการผสมสารละลายด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง บ่มทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร มีวิตามินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวกคำนวณหาค่าร้อยละของปฏิกิริยาการดักจับอนุมูลอิสระจากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{A_{\text{Blank}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

โดย A_{Blank} = ค่าการดูดกลืนแสงเอทานอล 95% ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

A_{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสง ของของตัวอย่างสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นก่อนทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

3.4.7 ศึกษาเกลือแร่เสริมในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้าน

อนุมูลอิสระของราเอนโดไฟต์

การศึกษานี้จะมีการเลือกเกลือแร่เสริมทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต, แคลเซียมคลอไรด์, โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมคลอไรด์ ที่จะนำมาเสริมในอาหาร PDB ที่ใช้ในการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ ซึ่งจะแบ่งการเลี้ยงออกเป็นทั้งหมด 6 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 ใช้อาหาร PDB อย่างเดียวเท่านั้นเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม แบบที่ 2 ใช้อาหาร PDB ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร แบบที่ 3 ใช้อาหาร PDB ผสมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร แบบที่ 4 ใช้อาหาร PDB ผสมกับโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร แบบที่ 5 ใช้อาหาร PDB ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อลิตร และแบบที่ 6 ใช้อาหารผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมคลอไรด์โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมคลอไรด์ที่อัตราส่วน 1:1:1:1 ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ใช้ ที่เจาะจุกคอรักขนาด 0.7 เซนติเมตร ตัดเชือกบริเวณปลายของเส้นใย นำวุ้นและเชื้อที่ตัดด้วยที่เจาะจุกคอรัก มาใส่ในอาหาร PDB ในพลาสติกที่เตรียมไว้ทั้ง 6 แบบ ทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ เลี้ยงในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรองแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 เก็บสารละลายที่แยกได้ไว้รอวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนของเส้นใยที่อยู่บนกระดาษกรอง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนัก เปรียบเทียบน้ำหนักเส้นใยที่ได้ระหว่างอาหารราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB เพียงอย่างเดียว กับอาหาร PDB ที่ใส่เกลือแร่เสริมได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์, แคลเซียมคาร์บอเนต, โซเดียมคลอไรด์, โซเดียมคาร์บอเนต และอาหาร PDB ที่มีการรวมกันของสารอาหารทั้ง 4 ชนิด (แคลเซียมคลอไรด์, แคลเซียมคาร์บอเนต, โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมคาร์บอเนต) จากนั้นนั้นเซลล์ของเชื้อราที่ได้จากการกรองไปทำการสกัดตามวิธีที่ 3.4.4 และนำไปทำการทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระตามวิธีที่ 3.4.5

3.4.8 การเก็บรักษาเชื้อราด้วยซิลิกาเจล

วิธีการนี้ใช้เก็บรักษาเชื้อราที่เป็นสปอร์ได้มากกว่า 11 ปี ซึ่งทางศูนย์ Fungal Genetic Stock ใช้เก็บรักษาเชื้อราที่มีความสำคัญทางพันธุศาสตร์เชื้ออยู่ได้คงตัว ทำได้โดยใช้ขวดขนาด 1 ออนซ์ บรรจุซิลิกาเจลขนาด 6-22 mesh ทำให้ปราศจากเชื้อความร้อน 180 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำขวดไปวางบนลาดภายในตู้เยือกแข็ง เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์โดยใช้หางนมผง เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เย็น เทลงในซิลิกาเจลที่เย็น ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ไม่ปิดฝาแน่น จนเห็นเม็ด ซิลิกาเจลแยกจากกัน ปิดขวดให้แน่น และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิห้องภายในภาชนะปิดซึ่งอากาศเข้าไม่ได้ เพื่อกันไม่ให้ซิลิกาเจลดูดความชื้น เมื่อจะเชื้อราออกมาเพาะเลี้ยง ให้ใช้เข็มเขี่ยซิลิกาเจล 2-3 เม็ด มาวางบนอาหารที่เหมาะสม

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อราและการทำให้บริสุทธิ์

การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากมะยมด้วยอาหาร PDA ได้ราที่มีโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 ไอโซเลต โดยมีการใช้รหัสแทนราแต่ละไอโซเลตดังนี้

ราไอโซเลตที่ 1 ใช้สัญลักษณ์ E 1

ราไอโซเลตที่ 2 ใช้สัญลักษณ์ E 2

ราไอโซเลตที่ 3 ใช้สัญลักษณ์ E 3

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

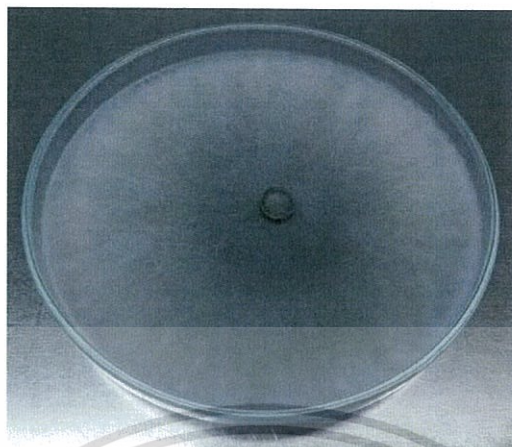
4.2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของราบนผิวหน้าอาหารแข็ง PDA

ลักษณะของโคโลนีที่ทำการศึกษา ได้แก่ สีของโคโลนี การสร้างสปอร์ ลักษณะของการสร้างเส้นใย แสดงลักษณะโคโลนีของเอนโดไฟต์ที่เป็นรา ดังนี้



รูปที่ 4.1 แสดงรูปร่างของโคโลนีเชื้อราไอโซเลต 1

จากภาพที่ 4.1 สังเกตลักษณะของโคโลนีเห็นได้ว่า เส้นใยของเชื้อรามีสีดำ ลักษณะเป็นสปอร์ของเชื้อรา ขอบเส้นใยมีสีขาวฟูกระจายรอบๆ เส้นใยสีดำ



รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างของโคโลนีเชื้อราไอโซเลต2

จากภาพที่ 4.2 สังเกตลักษณะของโคโลนีเห็นว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวแผ่กระจาย
เจริญได้ทั่วเพลท มีอัตราการเจริญมากสุดในทั้ง 3 ไอโซเลต

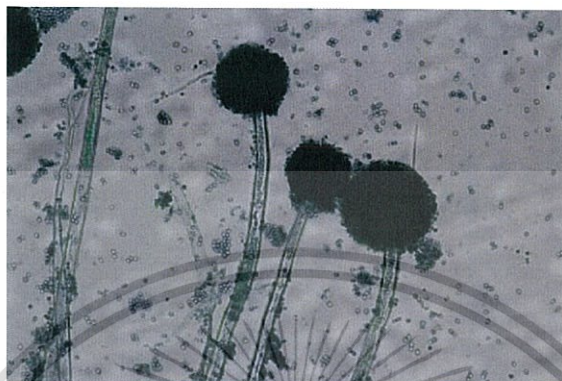


รูปที่ 4.3 แสดงรูปร่างของโคโลนีเชื้อราไอโซเลต3

จากภาพที่ 4.3 สังเกตลักษณะของโคโลนีเห็นว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวฟูเป็นกระจุก
หนาแน่นมากกว่าไอโซเลต2 เจริญไม่ทั่วทั้งเพลท อัตราการเจริญช้าสุดในทั้ง 3 ไอโซเลต

4.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะของเซลล์ราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ด้วยการย้อมสีเชื้อราด้วยสี Lactophenol cotton blue เพื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างของรา การสร้างสปอร์และการสร้างเส้นใย แสดงผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้



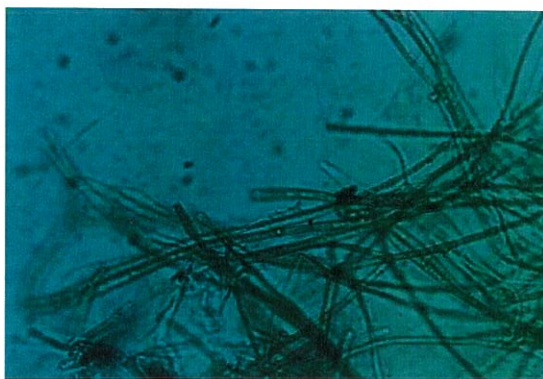
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต 1 จากกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า

จากภาพที่ 4.4 สังเกตทางสัณฐานวิทยาเห็นได้ว่า สังเกตเห็น conidiospore เส้นใยเป็นแบบไม่ผนังกัน ไม่สังเกตเห็น phialide และ vesicle



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต 2 จากกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า

จากภาพที่ 4.5 สังเกตทางสัณฐานวิทยาเห็นได้ว่า ไม่สังเกตเห็น phialide และ vesicle สร้างสปอร์แบบอาร์โทรสปอร์ เส้นใยเป็นแบบมีผนังกัน



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต2 จากกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า

จากภาพที่ 4.6 สังเกตทางสัณฐานวิทยาเห็นได้ว่า เส้นใยมีผนังกัน ไม่สังเกตเห็น phialide และ vesicle สังเกตเห็นแต่ละเซลล์ของเส้นใยมีขนาดใหญ่กว่าไอโซเลต 2 เส้นใยมีผนังกัน

4.2.3 การศึกษาคุณลักษณะราแอนโดไฟต์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

ผลการศึกษาคูณสมบัติบางประการของราแอนโดไฟต์ ได้แก่ ความสามารถในการสร้างกรด ด้วยอาหาร PDA ที่มีการผสมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple และอาหาร PDB ที่มีการผสมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple พบว่าราแอนโดไฟต์ที่ไอโซเลต1 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่ทำให้สีอาหารทั้งสองชนิดเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงว่ามีคุณสมบัติในการสร้างกรด ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความสามารถของราแอนโดไฟต์ที่มีการผลิตกรดบนอาหาร PDA และ PDB ที่มีการผสมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple

| ไอโซเลต | ผลการทดสอบในอาหาร PDA | ผลการทดสอบในอาหาร PDB |
|---------|-----------------------|-----------------------|
| control | - | - |
| E 1 | + | + |
| E 2 | - | - |
| E 3 | - | - |

*หมายเหตุ + เป็นสัญลักษณ์แทนการที่อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง
- เป็นสัญลักษณ์แทนการไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

โดยการศึกษาที่จัดทำขึ้นเพื่อเป็นการบ่งบอกสายพันธุ์เบื้องต้น โดยมีการสันนิษฐานจากลักษณะโคโลนีเบื้องต้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคุณสมบัติทางชีวเคมีว่า ไอโซเลต 1 มีลักษณะคล้ายกับ *Aspergillus* sp. เนื่องจากสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบ conidiospores ลักษณะตั้งตรงขึ้น บริเวณตรงปลายขยายออกมา มีรูปร่างค่อนข้างกลมและจากการทดสอบด้วยชีวเคมีพบว่าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่ามีคุณสมบัติในการผลิตกรดซึ่ง *Aspergillus* sp. มีความสามารถในการผลิตกรดได้เช่นกัน ส่วนไอโซเลต 2 คล้ายกับ *Geotrichum* เพราะจะเห็นได้ว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้างอาโทรสปอร์ มีโคนิเดีย ไม่มีสปorangium เป็นทรงกระบอกสั้น สร้างขึ้นมาจากการแบ่งตัวออก (segmentation) ของเส้นใย (นัยทัศน์, 2551) และไอโซเลต 3 มีลักษณะคล้ายกับ *Rhizoctonia* sp. ซึ่งต้องมีการศึกษาลำดับเบสบน 18SRNA ให้แน่ชัดต่อไป

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์

4.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงราเอนโดไฟต์เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ราโดยการเลี้ยงในอาหาร PDB เตรียมสารสกัดจากรามาใช้สำหรับการทดสอบโดยการแยกราออกจากน้ำหมักและการอบตะกอนเซลล์ก่อนนำมาสกัดทั้งโดยมีการนำราเอนโดไฟต์มาเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน 2 สภาวะ จากนั้นนำมาทำการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของราแต่ละไอโซเลตโดยนำเส้นใยที่อยู่บนกระดาษกรอง นำไปอบชั่งน้ำหนัก โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อราที่นำมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่สภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ($p < 0.01$)

| สภาวะในการเลี้ยง | ไอโซเลต | น้ำหนักเซลล์ \pm SE (กรัม) |
|---------------------------|---------|------------------------------|
| ไม่เขย่า | E1 | 1.04 \pm 0.04 ^d |
| | E2 | 0.51 \pm 0.03 ^e |
| | E3 | 0.07 \pm 0.01 ^f |
| เขย่า (200 รอบต่อนาที) | E1 | 1.84 \pm 0.04 ^c |
| | E2 | 2.25 \pm 0.10 ^b |
| | E3 | 2.77 \pm 0.16 ^a |

พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของทั้ง 3 ไอโซเลตในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีน้ำหนักมากกว่าสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากการละลายของออกซิเจน ซึ่งจากข้อจำกัดของการแพร่กระจายในปริมาณออกซิเจนในแบบตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้อง ทำให้การเจริญของเซลล์มีลักษณะเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวของของเหลว ซึ่งแตกต่างจากในแบบเขย่าที่เซลล์จะเกาะกันเป็นกลุ่ม ซึ่งช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับของเซลล์ ทำให้ได้อาหารและออกซิเจนเพิ่มขึ้นจึงเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบบตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่า (นฤมล, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำเซลล์แห้งที่ได้จากการกรองเซลล์และนำไปสกัด หาน้ำหนักสารสกัดสุดท้ายพบว่า ไอโซเลต1 มีน้ำหนักบองสารสกัดเมตาบอไลต์ที่ไม่แตกต่างกันทั้งสองสภาวะ ส่วนไอโซเลต2 และ ไอโซเลต3 จะให้สารเมตาบอไลต์ที่มากกว่าการเมื่อทำการสกัดจากเซลล์แห้งของราที่เลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลาดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักสารสกัดเมตาบอไลต์จากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลี้ยงในสภาวะที่ต่างกัน ($p < 0.01$)

| สภาวะในการเพาะเลี้ยง | ไอโซเลต | น้ำหนักเซลล์ \pm SE (กรัม) |
|---------------------------|---------|--------------------------------|
| ไม่เขย่า | E1 | 29.37 \pm 1.89 ^b |
| | E2 | 33.13 \pm 3.04 ^b |
| | E3 | 1.07 \pm 0.12 ^c |
| เขย่า (200 รอบต่อนาที) | E1 | 31.93 \pm 3.74 ^b |
| | E2 | 145.03 \pm 5.70 ^a |
| | E3 | 28.97 \pm 5.41 ^b |

จากนั้นนำสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์ หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH และหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteau

ผลของค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์แสดงในตารางที่ 4.4 และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ตารางผลของการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ($p < 0.01$)

| เมตาบอไลต์ | สภาวะการหมัก | การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH \pm SE % | | |
|-------------|--------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | E1 | E2 | E3 |
| ภายนอกเซลล์ | ตั้งทิ้ง | 39.40 \pm 0.20 ^b | 30.20 \pm 1.01 ^a | 34.61 \pm 1.59 ^b |
| | เขย่า | 58.54 \pm 1.25 ^a | 31.22 \pm 0.67 ^a | 45.62 \pm 2.92 ^a |
| ภายในเซลล์ | ตั้งทิ้ง | 7.26 \pm 0.37 ^c | 1.86 \pm 0.66 ^b | 1.18 \pm 0.53 ^c |
| | เขย่า | 8.06 \pm 1.46 ^c | 2.08 \pm 0.14 ^b | 1.96 \pm 0.11 ^c |

ตารางที่ 4.5 ตารางผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ($p < 0.01$)

| สารสกัด | สภาวะ | ปริมาณฟีนอลิกจากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ \pm SE ($\mu\text{g}/\text{mg}$) | | |
|---------------------------|----------|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| | | E1 | E2 | E3 |
| เมตาบอไลต์ ภายนอกเซลล์ | ไม่เขย่า | 1,605.90 \pm 10.43 ^a | 1,839.31 \pm 4.20 ^b | 2,087.19 \pm 9.20 ^a |
| | เขย่า | 1,669.59 \pm 22.10 ^a | 2,103.59 \pm 15.31 ^a | 2,071.76 \pm 7.28 ^a |
| เมตาบอไลต์ ภายในเซลล์ | ไม่เขย่า | 706.02 \pm 25.22 ^b | 679.01 \pm 2.55 ^c | 684.80 \pm 21.22 ^c |
| | เขย่า | 653.94 \pm 14.56 ^b | 600.89 \pm 28.42 ^d | 827.55 \pm 27.60 ^b |
| ตัวควบคุม | | 339.50 \pm 1.93 ^c | 339.50 \pm 1.93 ^e | 339.50 \pm 1.93 ^d |

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวที่มีการเขย่า มีน้ำหนักเซลล์แห้ง มีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ของทั้ง 3 ไอโซเลตมากกว่าในอาหารเหลวที่ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง สอดคล้องกับการศึกษาของ Frisvade และคณะ (2005) (Frisvad *et al.*, 2005)

4.3.2 ศึกษาเกลือแร่เสริมในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงราเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์รา โดยการศึกษาครั้งนี้จะมีการเลือกเกลือแร่เสริมทั้งหมด 4 ชนิด นำมาเสริมในอาหาร PDB ที่ใช้ในการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ ซึ่งจะแบ่งการเลี้ยงออกเป็นทั้งหมด 6 แบบ เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาทำการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของราแต่ละไอโซเลต โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งของราที่นำมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่มีการเติมเกลือแร่ที่แตกต่างกัน ($p < 0.01$)

| * การเติมเกลือแร่ | น้ำหนักเซลล์ \pm SE (กรัม) | | |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | E1 | E2 | E3 |
| ไม่เติมเกลือแร่ | 1.84 \pm 0.04 ^c | 2.25 \pm 0.05 ^a | 2.77 \pm 0.09 ^a |
| แคลเซียมคาร์บอเนต | 2.10 \pm 0.05 ^b | 2.48 \pm 0.09 ^a | 2.66 \pm 0.10 ^a |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 2.36 \pm 0.02 ^a | 2.47 \pm 0.22 ^a | 2.42 \pm 0.12 ^{ab} |
| โซเดียมคาร์บอเนต | 1.85 \pm 0.03 ^c | 2.09 \pm 0.01 ^a | 1.95 \pm 0.05 ^c |
| โซเดียมคลอไรด์ | 1.37 \pm 0.03 ^d | 2.21 \pm 0.01 ^a | 1.12 \pm 0.03 ^d |
| เติมเกลือแร่ทุกชนิด | 1.82 \pm 0.03 ^c | 2.46 \pm 0.13 ^a | 2.11 \pm 0.03 ^{bc} |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : ไม่เติมเกลือแร่ ใช้อาหาร PDB อย่างเดียวเท่านั้นเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม, แคลเซียมคาร์บอเนต, แคลเซียมคลอไรด์, โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมคลอไรด์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรใช้กับอาหาร PDB และเติมเกลือแร่ทุกชนิด ใช้อาหารผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต, แคลเซียมคลอไรด์, โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมคลอไรด์ที่ อัตราส่วน 1:1:1:1 อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลต มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากเมื่อแคลเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคาร์บอเนต ถูกละลายแล้วจะเกิดการแตกตัวเป็นไอออนของแคลเซียม ซึ่งมีส่วนช่วยการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Boumaaza และคณะ (2015) การแยก *Botrytis cinerea* ที่ได้จากใบและลำต้นของมะเขือเทศบริเวณประเทศอัลจีเรีย ศึกษาผลของเกลือ NaCl และ CaCl_2 ความเข้มข้น 50 ถึง 150 ppm พบว่าการเติม NaCl ทำให้เส้นใยเจริญได้มากที่สุด การเติม CaCl_2 ความเข้มข้น 300 ppm จะยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนี้เกลือทั้งสองชนิดจะช่วยการสร้างโคนิเดียได้ดีที่ความเข้มข้นประมาณ 50 ppm และจะการสร้างจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 100 หรือ 300 ppm (Boumaaza *et al.*, 2015)

เมื่อวัดปริมาณสารเมตาบอไลต์ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน แสดงได้ในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักเมตาบอไลต์จากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน ($p < 0.01$)

| การเติมเกลือแร่ | น้ำหนักเซลล์ \pm SE (กรัม) | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | E1 | E2 | E3 |
| ไม่เติมเกลือแร่ | 31.93 \pm 3.74 ^a | 145.03 \pm 5.70 ^a | 28.97 \pm 3.12 ^{de} |
| แคลเซียมคาร์บอเนต | 26.63 \pm 1.31 ^a | 73.70 \pm 5.69 ^{cd} | 112.17 \pm 4.69 ^a |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 25.57 \pm 2.88 ^a | 44.83 \pm 2.44 ^d | 43.47 \pm 5.76 ^{cd} |
| โซเดียมคาร์บอเนต | 26.23 \pm 0.85 ^a | 61.20 \pm 5.22 ^{de} | 46.73 \pm 2.42 ^c |
| โซเดียมคลอไรด์ | 12.90 \pm 0.95 ^b | 110.70 \pm 3.93 ^b | 23.67 \pm 3.07 ^e |
| เติมเกลือแร่ทุกชนิด | 32.27 \pm 1.79 ^a | 92.93 \pm 6.13 ^{bc} | 83.33 \pm 1.93 ^b |

ค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ แสดงไว้ในตารางที่ 4.8 ส่วนผลของค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์แสดงในตารางที่ 4.9 ผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากวิธี folin-ciocalteu ที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์แสดงในตารางที่ 4.10 และผลของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์แสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.8 ตารางผลของค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกล็ดแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)

| การเติมเกล็ดแร่ | การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH \pm SE % | | |
|---------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
| | E1 | E2 | E3 |
| ไม่มีการผสมเกล็ดแร่ | 45.75 \pm 0.72 ^e | 31.22 \pm 0.67 ^a | 45.62 \pm 2.92 ^c |
| แคลเซียมคาร์บอเนต | 58.15 \pm 0.14 ^c | 4.59 \pm 0.87 ^c | 42.20 \pm 0.43 ^c |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 54.53 \pm 1.25 ^d | 28.19 \pm 1.30 ^a | 19.12 \pm 0.67 ^d |
| โซเดียมคาร์บอเนต | 82.75 \pm 0.35 ^a | 6.57 \pm 0.15 ^c | 67.10 \pm 1.07 ^a |
| โซเดียมคลอไรด์ | 63.75 \pm 0.90 ^b | 16.51 \pm 0.70 ^b | 54.65 \pm 0.66 ^b |
| รวมเกล็ด | 54.38 \pm 0.83 ^d | 28.02 \pm 1.55 ^a | 6.87 \pm 0.88 ^e |

จากผลการทดลองพบว่า ไอโซเลต 1 มีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในอาหารที่มีการเติมเกล็ดแร่โซเดียมคาร์บอเนต มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 82.75 \pm 0.35% และมีค่าการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดที่ไม่มีการเติมเกล็ดแร่ ประมาณ 45.75 \pm 0.72% ไอโซเลต 2 สูงที่สุดเมื่อไม่มีการเติมเกล็ดแร่ มีค่าเท่ากับ 31.22 \pm 0.67% และน้อยที่สุดเมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 6.57 \pm 0.15% และไอโซเลต 3 สูงที่สุด เมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 67.10 \pm 1.07% และน้อยที่สุดมีเติมเกล็ดแร่รวมมีค่าเท่ากับ 6.87 \pm 0.88%

ตารางที่ 4.9 ตารางผลของค่าการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกล็ดแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)

| การเติมเกล็ดแร่ | การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH \pm SE % | | |
|----------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| | E1 | E2 | E3 |
| ไม่มีการเติมเกล็ดแร่ | 8.06 \pm 1.49 ^{ab} | 2.08 \pm 0.14 ^a | 1.96 \pm 0.11 ^a |
| แคลเซียมคาร์บอเนต | 0.66 \pm 0.38 ^c | 1.09 \pm 0.44 ^a | 0.87 \pm 0.36 ^a |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 9.34 \pm 0.82 ^a | 1.46 \pm 0.02 ^a | 1.40 \pm 0.07 ^a |
| โซเดียมคาร์บอเนต | 1.09 \pm 0.51 ^c | 1.36 \pm 0.16 ^a | 2.12 \pm 0.65 ^a |
| โซเดียมคลอไรด์ | 4.58 \pm 1.64 ^{bc} | 2.00 \pm 0.22 ^a | 1.01 \pm 0.55 ^a |
| เติมเกล็ดแร่ทั้งหมด | 7.26 \pm 0.37 ^{ab} | 2.39 \pm 0.64 ^a | 1.36 \pm 0.07 ^a |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตารางผลการทดลองที่ 4.9 ผลการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ ของทั้ง 3 ไอโซเลตพบว่า ไอโซเลต 1 มีค่าการต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดในอาหารที่มีการเติมเกลือแร่แคลเซียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ $9.34 \pm 0.82\%$ และน้อยที่สุดที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $0.66 \pm 0.38\%$ ในไอโซเลต 2 สูงที่สุดเมื่อมีการเติมเกลือแร่รวม มีค่าเท่ากับ $2.39 \pm 0.64\%$ และน้อยที่สุดเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 1.09 ± 0.44 และไอโซเลต 3 สูงที่สุดเมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2.12 \pm 0.65\%$ และน้อยที่สุดมีเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าเท่ากับ $0.87 \pm 0.36\%$

ตารางที่ 4.10 ตารางผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)

| การเติมเกลือแร่ | ปริมาณฟีนอลิกจากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) | | |
|---------------------|--|------------------------|------------------------|
| | E1 | E2 | E3 |
| ตัวควบคุม | 389.66 ± 6.75^e | 389.66 ± 6.75^d | 389.66 ± 6.75^f |
| ไม่มีการผสมเกลือแร่ | $1,669.59 \pm 22.10^b$ | $2,103.59 \pm 15.31^a$ | $2,071.76 \pm 7.28^b$ |
| แคลเซียมคาร์บอเนต | $1,455.44 \pm 16.71^c$ | $2,146.99 \pm 44.92^a$ | $1,718.75 \pm 24.72^c$ |
| แคลเซียมคลอไรด์ | $1,276.04 \pm 63.46^d$ | $1,358.99 \pm 21.55^c$ | $1,237.46 \pm 16.40^e$ |
| โซเดียมคาร์บอเนต | $2,303.24 \pm 22.97^a$ | $1,936.73 \pm 19.58^b$ | $2,337.00 \pm 12.76^a$ |
| โซเดียมคลอไรด์ | $1,467.98 \pm 62.16^c$ | $1,370.56 \pm 12.54^c$ | $1,222.03 \pm 10.74^e$ |
| เติมเกลือแร่ทั้งหมด | $1,683.06 \pm 4.82^b$ | $1,908.76 \pm 6.32^b$ | $1,624.23 \pm 5.10^d$ |

จากการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ ของทั้ง 3 ไอโซเลตพบว่า ไอโซเลต 1 มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดในอาหารที่มีการเติมเกลือแร่โซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2,303.24 \pm 22.97 \mu\text{g}/\text{mg}$ และน้อยที่สุดที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $1,455.44 \pm 16.71 \mu\text{g}/\text{mg}$ ในไอโซเลต 2 สูงที่สุดเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2,146.99 \pm 44.92 \mu\text{g}/\text{mg}$ และน้อยที่สุดเมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ $1,358.99 \pm 21.55 \mu\text{g}/\text{mg}$ และไอโซเลต 3 สูงที่สุดเมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2,337.00 \pm 12.76 \mu\text{g}/\text{mg}$ และน้อยที่สุดมีเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $1,222.03 \pm 10.74 \mu\text{g}/\text{mg}$

ตารางที่ 4.11 ตารางผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มี ส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต ($p < 0.01$)

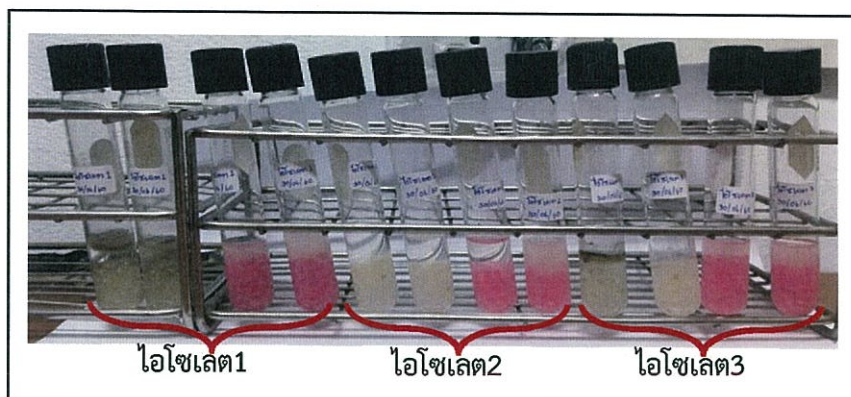
| การเติมเกลือแร่ | ปริมาณฟีนอลิกจากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) | | |
|---------------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| | E1 | E2 | E3 |
| ตัวควบคุม | 389.66 \pm 6.75 ^f | 389.66 \pm 6.75 ^d | 389.66 \pm 6.75 ^e |
| ไม่มีการผสมเกลือแร่ | 653.94 \pm 47.81 ^c | 542.05 \pm 58.74 ^c | 827.55 \pm 27.60 ^b |
| แคลเซียมคาร์บอเนต | 704.09 \pm 4.42 ^b | 677.08 \pm 7.66 ^b | 585.46 \pm 2.55 ^d |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 454.28 \pm 15.94 ^e | 521.80 \pm 5.10 ^c | 658.76 \pm 9.20 ^{cd} |
| โซเดียมคาร์บอเนต | 503.47 \pm 46.15 ^d | 1,485.34 \pm 36.04 ^a | 905.67 \pm 30.62 ^a |
| โซเดียมคลอไรด์ | 996.33 \pm 22.48 ^a | 1,572.15 \pm 19.36 ^a | 657.79 \pm 12.98 ^{cd} |
| เติมเกลือแร่ทั้งหมด | 462.00 \pm 15.94 ^{de} | 611.50 \pm 3.86 ^{bc} | 722.42 \pm 12.09 ^c |

จากการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ ของทั้ง 3 ไอโซเลตพบว่า ไอโซเลต 1 มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดในอาหารที่มีการเติมเกลือแร่โซเดียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 996.33 \pm 22.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ และน้อยที่สุดที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 454.28 \pm 15.94 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ในไอโซเลต 2 สูงที่สุดเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 1,572.15 \pm 19.36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ และน้อยที่สุดเมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 521.80 \pm 5.10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ และไอโซเลต 3 สูงที่สุดเมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 905.67 \pm 30.62 และน้อยที่สุดมีเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 585.46 \pm 2.55 $\mu\text{g}/\text{mg}$

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าทั้งปริมาณฟีนอลิกกับฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระในสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์จะดีกว่าสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ravindran และคณะ (2012) (Ravindran *et al.*, 2012) และเซลล์จะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเติมเกลือแร่ (Matsuda *et al.*, 2006)

4.4 การเก็บรักษาเชื้อราด้วยซิลิกาเจล

ในการเก็บรักษาเชื้อราด้วยซิลิกาเจล มีการใช้ซิลิกาเจลทั้งหมด 2 สี ได้แก่ สีขาวและสีฟ้า เมื่อทำการเติมสารละลายเชื้อราในทางนกลงไปจะเห็นว่าซิลิกาเจลสีฟ้าจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู เนื่องจากซิลิกาเจลมีการดูดความชื้น ดังแสดงในรูปที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 ซึ่งถ่ายหลังจากการถ่ายเชื้อลงไป ในซิลิกาเจลในหลอดเก็บเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ถ่ายเมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม 2560)



รูปที่ 4.7 แสดงผลการเก็บรักษาเชื้อราในซลิคาเจลของทั้ง 3 ไอโซเลต

จากการทำการทดลองใช้เวลาให้ซลิคาเจลแห้งเป็นเวลา 15 วัน หลังจากการถ่ายเชื้อ จากนั้นปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการเก็บรักษาเชื้อรา จนกว่าจะนำมาใช้ โดยการใช้ครีมคืบเมล็ดซลิคาเจลประมาณ 2-3 เม็ด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสม จะเห็นโคโคนีราเกิดขึ้นรอบๆเมล็ดซลิคาเจล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการแยกราเอนโดไฟต์จากผลมะยมบนอาหารแข็ง PDA พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ โดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนี, สีของโคโลนี, การสร้างสปอร์, ลักษณะของการสร้างเส้นใย พบว่าลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในกลุ่มตัวอย่าง การศึกษาลักษณะของราเอนโดไฟต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ด้วยการย้อมสีเชื้อราด้วยสี Lactophenol cotton blue เพื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างของรา การสร้างสปอร์ และการสร้างเส้นใย จะมีลักษณะแตกต่างกัน ไอโซเลต 1 สร้างสปอร์แบบ ไม้อาศัยเพศแบบโคนินเดีย ฐานของโคนินเดีย เรียกว่า phialides เส้นใยเป็นแบบไม่ผนังกัน ส่วนไอโซเลตที่ 2 เส้นใยมีผนังกัน มีโคนินเดีย สร้างสปอร์แบบฮาโทรสปอร์ ไอโซเลต 3 เส้นใยมีผนังกัน ไม่สังเกตเห็นสปอร์แบบอาศัยเพศ

การศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมีของราเอนโดไฟต์ ทั้ง 3 ไอโซเลต โดยผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของราเอนโดไฟต์ ได้แก่ ความสามารถในการสร้างกรดด้วยอาหาร PDA ที่มีการผสมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple และอาหาร PDB ที่มีการผสมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple พบว่าราเอนโดไฟต์ที่ไอโซเลต 1 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่ทำให้สีอาหารทั้งสองชนิดเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองซึ่งแสดงว่ามีคุณสมบัติในการสร้างกรด

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์เจริญเติบโตนั้น พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของทั้ง 3 ไอโซเลตในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีมีน้ำหนักมากกว่าสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องทั้งไอโซเลต 3 มีการเจริญเติบโตสูงสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.77 ± 0.16 กรัม และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของราเอนโดไฟต์ ด้วยวิธีการทดสอบการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี folin-ciocalteau พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อเลือกสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกัน พบว่าน้ำหนักที่มากที่สุดคือไอโซเลต 1 เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 2.36 ± 0.02 กรัม, ไอโซเลต ไอโซเลต 2 เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 2.48 ± 0.09 กรัม และไอโซเลต 3 อยู่ในสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือแร่ มีค่าเท่ากับ 2.77 ± 0.09 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ 2.66 ± 0.1 กรัม

ผลของค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระของราเอนโดไฟต์ของสารสกัดภายนอกเซลล์มีค่าสูงกว่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ ไอโซเลต 1 เมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ $82.75 \pm 0.35\%$, ไอโซเลต 2 เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $77.49 \pm 0.7\%$ และไอโซเลต 3 เมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $67.10 \pm 1.07\%$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณสารฟีนอลิก พบว่าสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์จะมีสารฟีนอลิกน้อยกว่าสารสกัดภายนอกเซลล์ ไอโซเลต1 เมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2,303.24 \pm 12.76 \mu\text{g}/\text{mg}$, ไอโซเลต2 เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2,146.99 \pm 44.92 \mu\text{g}/\text{mg}$ และไอโซเลต3 เมื่อมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนต มีค่าเท่ากับ $2,337.00 \pm 12.76 \mu\text{g}/\text{mg}$ ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงในลำดับถัดไป ควรจะต้องทำการศึกษาลำดับเบสของ 18SRNA ต่อไป เพื่อความแม่นยำในการจำแนกชนิดแบคทีเรีย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร

1. Potato dextrose agar

| | | |
|--|---------------|-----------|
| Potato peptone (เทียบเท่ากับมันฝรั่ง 200 กรัม) | 4 | กรัม |
| Glucose | 20 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH | 5.6 ± 0.2 | |

2. Potato dextrose broth

| | | |
|------------------------|---------------|-----------|
| Potatoes infusion from | 200 | กรัม |
| Dextrose | 20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH | 5.1 ± 0.2 | |

ภาคผนวก ข

การเตรียมตัวอย่างและสารเคมี

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH Assay

1.1 การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

- การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.50 มิลลิโมลาร์ (มวลโมเลกุลของ DPPH เท่ากับ 394.32 กรัม) โดยชั่ง DPPH มา 0.0197 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนได้ 100 มิลลิลิตรในขวดปริมาตร
- ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic Stirrer) จนสารละลายหมด
- เก็บสารละลาย DPPH ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ทดสอบปฏิกิริยา

1.2 การเตรียมสารละลายวิตามินซี (Ascorbic acid)

- เตรียมสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง Ascorbic acid ปริมาตร 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
- เก็บสารละลาย Ascorbic acid ที่ได้ในขวดสีชา ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ทดสอบปฏิกิริยา

2. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu

2.1 การเตรียมสารละลาย folin-ciocalteu ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ดูดสารละลาย folin-ciocalteu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3) ที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2.3 เตรียมสารละลายแกลลิก แอซิด (Gallic acid) เตรียมสารละลายแกลลิก แอซิด เพื่อทำกราฟมาตรฐานที่โดยชั่งแกลลิก แอซิด ปริมาตร 0, 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครกรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

3.1 สารสกัดจากสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ (ของเหลวที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา)

- เตรียมสารสกัดที่ 2 เท่า นำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิตรละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
- เตรียมสารสกัดที่ 5 เท่า นำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิตรละลายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร
- เตรียมสารสกัดที่ 10 เท่า นำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิตรละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

3.2 สารสกัดจากสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ (ของแข็ง) เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ลักษณะรูปร่างของราโดยกล้องจุลทรรศน์

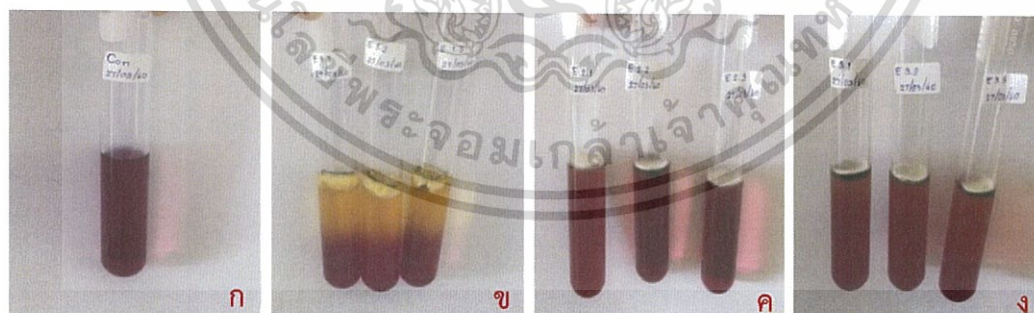
- 1.1 หยดสี Lactophenol cotton blue ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
- 1.2 ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยของราราวงบนสี Lactophenol cotton blue ที่หยดไว้บนสไลด์
- 1.3 ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
- 1.4 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การทดสอบชีวเคมีของรา (สุณิษา,2557)

ราแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการผลิตกรดต่างกัน เช่น บางชนิดผลิตกรด บางชนิดไม่ผลิตกรด โดยการศึกษาที่ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple ที่เติมลงไปในอาหาร

2.1 การทดสอบชีวเคมีของราในอาหารเหลว

เตรียมอาหาร PDB ในหลอดทดลองที่มีการเติมสาร Bromocresol Purple ลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้อาหาร PDB ที่เป็นสีม่วงซึ่งมีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 6.8 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยของราเอนโดไฟต์บนจานเพาะเชื้อลงในหลอดที่มีอาหารผสมอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำไปหมักในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำวิธีนี้ดัดแปลงวิธีจากงานวิจัยของสุณิษา สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลง เมื่อราเอนโดไฟต์มีการสร้างกรดซึ่งอาหารจะมีพีเอชประมาณ 5.2 จะเห็นว่าอาการในหลอดทดลองจะมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองดังรูปที่ 1

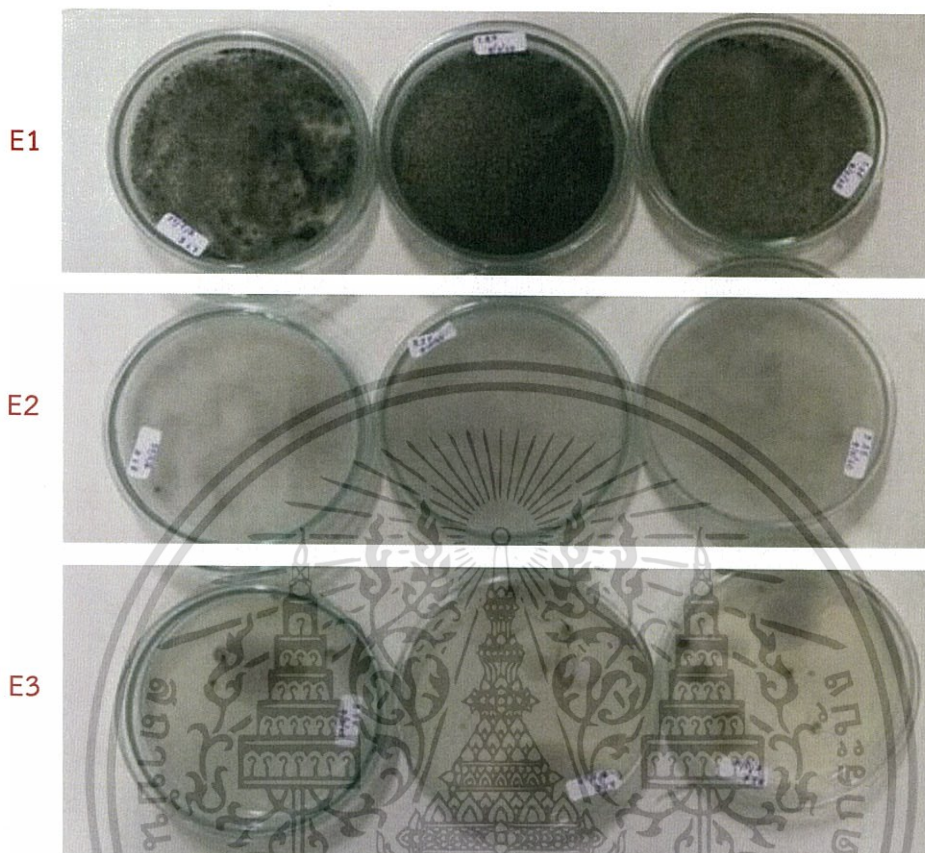


รูปที่ 1ค รูปการแสดงการเปลี่ยนแปลงในสีของอาหาร PDB ที่มีการเติมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple (ก) หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อราลงไปให้ผลเป็นลบ,(ข) หลอดทดสอบไอโซเลต1 สีอาหารมีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากการผลิตกรด,(ค)หลอดทดสอบไอโซเลต E2 สีอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากไม่มีการผลิตกรด,(ง)หลอดทดสอบไอโซเลต3 สีอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากไม่มีการผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดสอบชีวเคมีในอาหารเหลว

นำอาหาร PDB ที่ใช้ในการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ มีทำการสเปดบนอาหาร PDA เพื่อเป็นการทดสอบว่าไม่มีเชื้อตัวอื่นปนเปื้อนและมาทำการสร้างกรดทำให้อาหาร PDB เปลี่ยนสี ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ค. เพลทที่ใช้ในการยืนยันผลว่าในหลอดทดลองว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น นอกจากราที่ต้องการทดสอบจากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าเพลท E1 ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น เพลท E2, เพลท E3 มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นแต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร

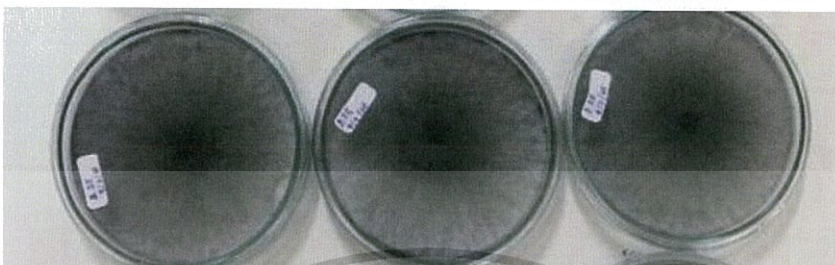
2.3 การทดสอบชีวเคมีของราในอาหารแข็ง

นำโคโลนีราและวุ้นที่เจาะด้วยที่เจาะจุกคอร์ก นำมาวางไว้บนอาหาร PDA ที่มีการเติม Bromocresol Purple ลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้อาหาร PDA ที่เป็นสีม่วงซึ่งมีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 6.8 หากราผลิตกรดจะเกิดเป็นสีเหลืองรอบๆวงของวุ้นและโคโลนีราที่เจาะด้วยที่เจาะจุกคอร์กที่วางไว้บนอาหาร PDA ดังรูปที่ 3

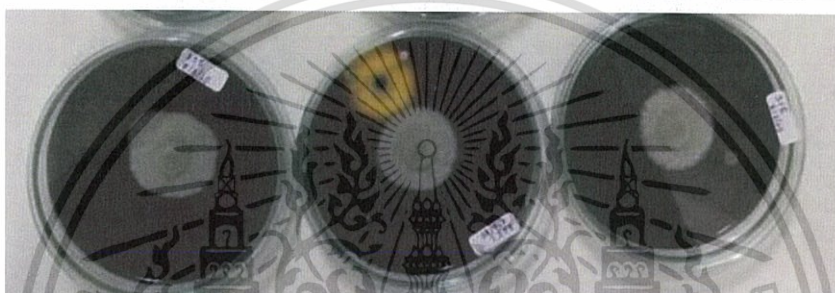
E1



E2



E3



รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงในสีของอาหาร PDA ที่มีการเติมอินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple เพลททดสอบไอโซเลต 1 สีอาหารมีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากการผลิตกรด, เพลททดสอบไอโซเลต 2 สีอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากการไม่มีการผลิตกรด และเพลททดสอบไอโซเลต 3 สีอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเนื่องจากการไม่มีการผลิตกรดแต่มีการเกิดจุดสีเหลืองเล็กน้อยจำนวนหนึ่งเพลทเนื่องจากปนเปื้อนราที่มีการผลิตกรด

การแปลผล

สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แสดงว่าเกิดกรด ในการอ่านผล ปฏิกริยา ของราที่มีการสร้างกรดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอินดิเคเตอร์

- + หมายถึง เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารแสดงว่ามีการสร้างกรด
- หมายถึง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารแสดงว่าไม่มีการสร้างกรด

3. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

3.1 การหาค่าการดูดกลืนแสงสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก นำสารละลายกรดแอสคอบิกในแต่ ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสม กับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสม สารละลายให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH) เมื่อ ได้ค่าแล้วนำไปเขียนลงกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การหาการดูดกลืนแสงสารละลายตัวอย่าง

- เตรียมสารละลายตัวอย่างเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH)

- เตรียมสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH)

- การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายที่ใช้ละลายอนุภาค DPPH คือ ตัวทำละลายเอทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH)

- เติมสารละลาย DPPH 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมเพลท (96-well plate) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH)

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\text{สูตรคำนวณ } \% \text{inhibition} = \left(\frac{A_{\text{Blank}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

โดย A_{Blank} = ค่าการดูดกลืนแสงเอทานอล 95% ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

A_{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสง ของของตัวอย่างสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นก่อนทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

4. วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

4.1 การหาค่าการดูดกลืนแสงสารมาตรฐานแกลลิก แอซีส

นำสารละลายแกลลิก แอซีสที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 64 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 256 ไมโครลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 160 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 320 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วดูดลงในหลุมไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH) เมื่อได้ค่าแล้วนำไปพล็อตลงเป็นกราฟมาตรฐาน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การหาการดูดกลืนแสงสารละลายตัวอย่าง

- เตรียมสารละลายตัวอย่างเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 64 ไมโครลิตร เติมนสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 256 ไมโครลิตร เติมนโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 160 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 320 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วดูดลงในหลุมไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH)
- เตรียมสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 เท่า ปริมาตร 64 ไมโครลิตร เติมนสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 256 ไมโครลิตร เติมนโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 160 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 320 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วดูดลงในหลุมไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (ADPPH)
- การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย ตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 64 ไมโครลิตร เติมนสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 256 ไมโครลิตร เติมนโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 160 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 320 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วดูดลงในหลุมไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว รีดเดอร์ (ADPPH)
- การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจาก สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ง

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 1ง ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | %inhibition |
|-------------------|---------|-----|------------------|-------------|
| ตั้งทิ้ง | 1 | 1 | 0.811 | 39.6727 |
| | | 2 | 0.813 | 39.5239 |
| | | 3 | 0.820 | 39.0032 |
| | 2 | 1 | 0.963 | 28.3660 |
| | | 2 | 0.936 | 30.3744 |
| | | 3 | 0.916 | 31.8621 |
| | 3 | 1 | 0.843 | 37.2923 |
| | | 2 | 0.877 | 34.7632 |
| | | 3 | 0.917 | 31.7878 |
| เขย่า | 1 | 1 | 0.556 | 58.6412 |
| | | 2 | 0.587 | 56.3352 |
| | | 3 | 0.529 | 60.6496 |
| | 2 | 1 | 0.939 | 30.1513 |
| | | 2 | 0.908 | 32.4572 |
| | | 3 | 0.927 | 31.0439 |
| | 3 | 1 | 0.783 | 41.7555 |
| | | 2 | 0.756 | 43.7639 |
| | | 3 | 0.654 | 51.3514 |
| CaCO ₃ | 1 | 1 | 0.564 | 58.0461 |
| | | 2 | 0.565 | 57.9717 |
| | | 3 | 0.559 | 58.4181 |
| | 2 | 1 | 0.293 | 4.3392 |
| | | 2 | 0.293 | 6.1989 |
| | | 3 | 0.322 | 3.2234 |
| | 3 | 1 | 0.767 | 42.9457 |
| | | 2 | 0.787 | 41.4580 |
| | | 3 | 0.777 | 42.2018 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1ง (ต่อ) ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | %inhibition |
|---------------------------------|---------|-----|------------------|-------------|
| CaCl ₂ | 1 | 1 | 0.605 | 54.9963 |
| | | 2 | 0.586 | 56.4096 |
| | | 3 | 0.643 | 52.1696 |
| | 2 | 1 | 0.973 | 27.6221 |
| | | 2 | 0.932 | 30.6720 |
| | | 3 | 0.991 | 26.2832 |
| | 3 | 1 | 1.071 | 20.3323 |
| | | 2 | 1.089 | 18.9933 |
| | | 3 | 1.102 | 18.0263 |
| Na ₂ CO ₃ | 1 | 1 | 0.223 | 83.4119 |
| | | 2 | 0.236 | 82.4448 |
| | | 3 | 0.238 | 82.2961 |
| | 2 | 1 | 1.259 | 6.3476 |
| | | 2 | 1.257 | 6.4964 |
| | | 3 | 1.252 | 6.8683 |
| | 3 | 1 | 0.452 | 66.3774 |
| | | 2 | 0.414 | 69.2041 |
| | | 3 | 0.461 | 65.7079 |
| NaCl | 1 | 1 | 0.467 | 65.2616 |
| | | 2 | 0.509 | 62.1374 |
| | | 3 | 0.486 | 63.8483 |
| | 2 | 1 | 1.104 | 17.8775 |
| | | 2 | 1.128 | 16.0922 |
| | | 3 | 1.135 | 15.5715 |
| | 3 | 1 | 0.627 | 53.3598 |
| | | 2 | 0.598 | 55.5170 |
| | | 3 | 0.604 | 55.0707 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1ง (ต่อ) ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | %inhibition |
|--------------|---------|-----|------------------|-------------|
| รวม เกลือ | 1 | 1 | 0.591 | 56.0377 |
| | | 2 | 0.624 | 53.5829 |
| | | 3 | 0.625 | 53.5086 |
| | 2 | 1 | 0.971 | 27.7709 |
| | | 2 | 1.002 | 25.4649 |
| | | 3 | 0.930 | 30.8207 |
| | 3 | 1 | 1.255 | 6.6452 |
| | | 2 | 1.232 | 8.3561 |
| | | 3 | 1.269 | 5.6038 |

ตารางที่ 2ง ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายในเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | %inhibition |
|----------|---------|-----|------------------|-------------|
| ตั้งทิ้ง | 1 | 1 | 1.493 | 7.6304 |
| | | 2 | 1.493 | 7.6304 |
| | | 3 | 1.511 | 6.5168 |
| | 2 | 1 | 1.598 | 1.1343 |
| | | 2 | 1.596 | 1.2580 |
| | | 3 | 1.565 | 3.1759 |
| | 3 | 1 | 1.592 | 1.5055 |
| | | 2 | 1.614 | 0.1444 |
| | | 3 | 1.586 | 1.8767 |
| เขย่า | 1 | 1 | 1.534 | 5.0938 |
| | | 2 | 1.461 | 9.6102 |
| | | 3 | 1.463 | 9.4865 |
| | 2 | 1 | 1.585 | 1.9385 |
| | | 2 | 1.585 | 1.9385 |
| | | 3 | 1.578 | 2.3716 |
| | 3 | 1 | 1.581 | 2.1860 |
| | | 2 | 1.586 | 1.8767 |
| | | 3 | 1.587 | 1.8148 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2ง (ต่อ) ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายในเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | %inhibition |
|---------------------------------|---------|-----|------------------|-------------|
| CaCO ₃ | 1 | 1 | 1.594 | 1.3817 |
| | | 2 | 1.615 | 0.0825 |
| | | 3 | 1.608 | 0.5156 |
| | 2 | 1 | 1.592 | 1.5055 |
| | | 2 | 1.613 | 0.2062 |
| | | 3 | 1.591 | 1.5673 |
| | 3 | 1 | 1.595 | 1.3199 |
| | | 2 | 1.614 | 0.1444 |
| | | 3 | 1.598 | 1.1343 |
| CaCl ₂ | 1 | 1 | 1.439 | 10.9713 |
| | | 2 | 1.476 | 8.6822 |
| | | 3 | 1.481 | 8.3729 |
| | 2 | 1 | 1.592 | 1.5055 |
| | | 2 | 1.593 | 1.4436 |
| | | 3 | 1.593 | 1.4436 |
| | 3 | 1 | 1.596 | 1.2580 |
| | | 2 | 1.593 | 1.4436 |
| | | 3 | 1.592 | 1.5055 |
| Na ₂ CO ₃ | 1 | 1 | 1.591 | 1.5673 |
| | | 2 | 1.590 | 1.6292 |
| | | 3 | 1.615 | 0.0825 |
| | 2 | 1 | 1.590 | 1.6292 |
| | | 2 | 1.594 | 1.3817 |
| | | 3 | 1.599 | 1.0724 |
| | 3 | 1 | 1.599 | 1.0724 |
| | | 2 | 1.584 | 2.0004 |
| | | 3 | 1.563 | 3.2996 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2ง (ต่อ) ผลการคำนวณ DPPH ของเมตาบอไลต์ภายในเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | %inhibition |
|--------------|---------|-----|------------------|-------------|
| NaCl | 1 | 1 | 1.492 | 7.6923 |
| | | 2 | 1.553 | 3.9183 |
| | | 3 | 1.582 | 2.1241 |
| | 2 | 1 | 1.582 | 2.1241 |
| | | 2 | 1.579 | 2.3098 |
| | | 3 | 1.591 | 1.5673 |
| | 3 | 1 | 1.599 | 1.0724 |
| | | 2 | 1.616 | 0.0206 |
| | | 3 | 1.585 | 1.9385 |
| รวม เกลือ | 1 | 1 | 1.493 | 7.6304 |
| | | 2 | 1.493 | 7.6304 |
| | | 3 | 1.511 | 6.5168 |
| | 2 | 1 | 1.598 | 1.1343 |
| | | 2 | 1.570 | 2.8666 |
| | | 3 | 1.565 | 3.1759 |
| | 3 | 1 | 1.596 | 1.2580 |
| | | 2 | 1.592 | 1.5055 |
| | | 3 | 1.595 | 1.3199 |

ตารางที่ 3ง ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | ฟีนอลิก($\mu\text{g/ml}$) |
|----------|---------|-----|------------------|-----------------------------|
| ตั้งทิ้ง | 1 | 1 | 0.548 | 1585.65 |
| | | 2 | 0.560 | 1620.37 |
| | | 3 | 0.557 | 1611.69 |
| | 2 | 1 | 0.633 | 1831.60 |
| | | 2 | 0.636 | 1840.28 |
| | | 3 | 0.638 | 1846.06 |
| | 3 | 1 | 0.715 | 2068.87 |
| | | 2 | 0.725 | 2097.80 |
| | | 3 | 0.724 | 2094.91 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3ง (ต่อ) ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์
ภายนอกเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | ฟีนอลิก($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------------|---------|-----|------------------|-----------------------------|
| เขย่า | 1 | 1 | 0.567 | 1640.63 |
| | | 2 | 0.572 | 1655.09 |
| | | 3 | 0.592 | 1712.96 |
| | 2 | 1 | 0.717 | 2074.65 |
| | | 2 | 0.729 | 2109.38 |
| | | 3 | 0.735 | 2126.74 |
| | 3 | 1 | 0.713 | 2063.08 |
| | | 2 | 0.721 | 2086.23 |
| | | 3 | 0.714 | 2065.97 |
| CaCO_3 | 1 | 1 | 0.493 | 1426.50 |
| | | 2 | 0.503 | 1455.44 |
| | | 3 | 0.513 | 1484.38 |
| | 2 | 1 | 0.711 | 2057.29 |
| | | 2 | 0.756 | 2187.50 |
| | | 3 | 0.759 | 2196.18 |
| | 3 | 1 | 0.604 | 1747.69 |
| | | 2 | 0.601 | 1739.00 |
| | | 3 | 0.577 | 1669.56 |
| CaCl_2 | 1 | 1 | 0.412 | 1192.13 |
| | | 2 | 0.427 | 1235.53 |
| | | 3 | 0.484 | 1400.46 |
| | 2 | 1 | 0.484 | 1400.46 |
| | | 2 | 0.466 | 1348.38 |
| | | 3 | 0.459 | 1328.13 |
| | 3 | 1 | 0.422 | 1221.06 |
| | | 2 | 0.439 | 1270.25 |
| | | 3 | 0.422 | 1221.06 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3ง (ต่อ) ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์
ภายนอกเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | ฟีนอลิก ($\mu\text{g/ml}$) |
|--------------------------|---------|-----|------------------|---------------------------------|
| Na_2CO_3 | 1 | 1 | 0.808 | 2337.96 |
| | | 2 | 0.781 | 2259.84 |
| | | 3 | 0.799 | 2311.92 |
| | 2 | 1 | 0.674 | 1950.23 |
| | | 2 | 0.678 | 1961.81 |
| | | 3 | 0.656 | 1898.15 |
| | 3 | 1 | 0.816 | 2361.11 |
| | | 2 | 0.806 | 2332.18 |
| | | 3 | 0.801 | 2317.71 |
| NaCl | 1 | 1 | 0.475 | 1374.42 |
| | | 2 | 0.499 | 1443.87 |
| | | 3 | 0.548 | 1585.65 |
| | 2 | 1 | 0.466 | 1348.38 |
| | | 2 | 0.474 | 1371.53 |
| | | 3 | 0.481 | 1391.78 |
| | 3 | 1 | 0.415 | 1200.81 |
| | | 2 | 0.427 | 1235.53 |
| | | 3 | 0.425 | 1229.75 |
| รวม เกลือ | 1 | 1 | 0.580 | 1678.24 |
| | | 2 | 0.580 | 1678.24 |
| | | 3 | 0.585 | 1692.71 |
| | 2 | 1 | 0.658 | 1903.94 |
| | | 2 | 0.657 | 1901.04 |
| | | 3 | 0.664 | 1921.30 |
| | 3 | 1 | 0.558 | 1614.58 |
| | | 2 | 0.562 | 1626.16 |
| | | 3 | 0.564 | 1631.94 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4ง ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์ภายใน เซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | ฟีนอลิก($\mu\text{g/ml}$) |
|-------------------|---------|-----|------------------|-----------------------------|
| ตั้งทิ้ง | 1 | 1 | 0.242 | 700.23 |
| | | 2 | 0.260 | 752.31 |
| | | 3 | 0.230 | 665.51 |
| | 2 | 1 | 0.235 | 679.98 |
| | | 2 | 0.233 | 674.19 |
| | | 3 | 0.236 | 682.87 |
| | 3 | 1 | 0.222 | 642.36 |
| | | 2 | 0.244 | 706.02 |
| | | 3 | 0.244 | 706.02 |
| เขย่า | 1 | 1 | 0.230 | 665.51 |
| | | 2 | 0.216 | 625.00 |
| | | 3 | 0.232 | 671.30 |
| | 2 | 1 | 0.201 | 581.60 |
| | | 2 | 0.195 | 564.24 |
| | | 3 | 0.227 | 656.83 |
| | 3 | 1 | 0.305 | 882.52 |
| | | 2 | 0.275 | 795.72 |
| | | 3 | 0.278 | 804.40 |
| CaCO ₃ | 1 | 1 | 0.254 | 734.95 |
| | | 2 | 0.246 | 711.81 |
| | | 3 | 0.230 | 665.51 |
| | 2 | 1 | 0.238 | 688.66 |
| | | 2 | 0.235 | 679.98 |
| | | 3 | 0.229 | 662.62 |
| | 3 | 1 | 0.204 | 590.28 |
| | | 2 | 0.202 | 584.49 |
| | | 3 | 0.201 | 581.60 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4ง (ต่อ) ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอไลต์
ภายในเซลล์

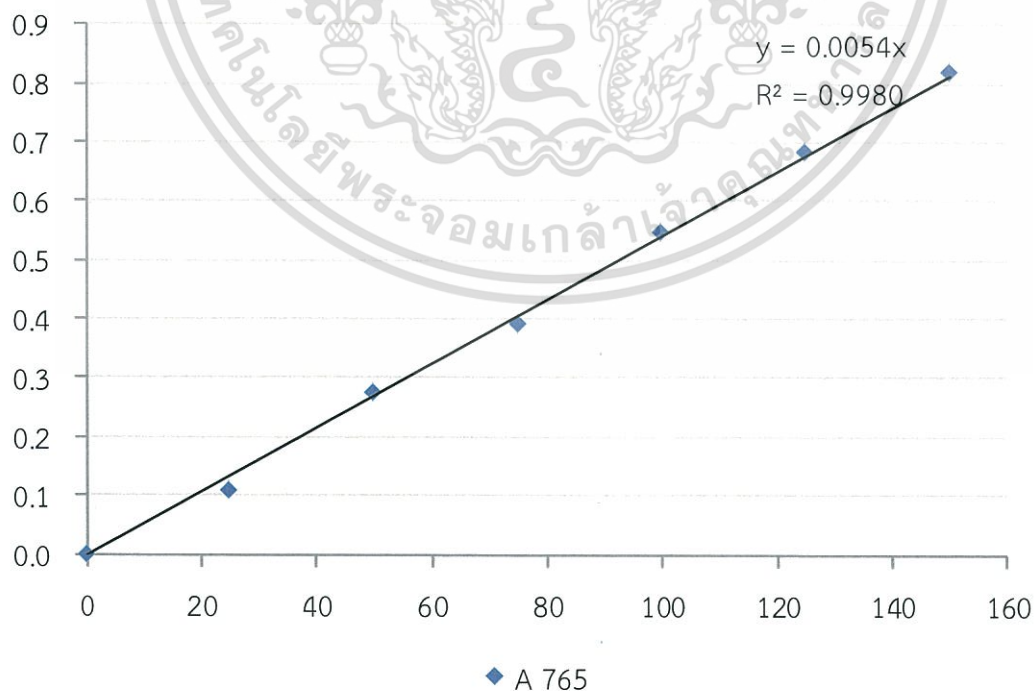
| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | ฟีนอลิก($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------------------|---------|-----|------------------|-----------------------------|
| CaCl ₂ | 1 | 1 | 0.157 | 454.28 |
| | | 2 | 0.156 | 451.39 |
| | | 3 | 0.158 | 457.18 |
| | 2 | 1 | 0.183 | 529.51 |
| | | 2 | 0.177 | 512.15 |
| | | 3 | 0.181 | 523.73 |
| | 3 | 1 | 0.234 | 677.08 |
| | | 2 | 0.225 | 651.04 |
| | | 3 | 0.224 | 648.15 |
| Na ₂ CO ₃ | 1 | 1 | 0.174 | 503.47 |
| | | 2 | 0.173 | 500.58 |
| | | 3 | 0.175 | 506.37 |
| | 2 | 1 | 0.504 | 1458.33 |
| | | 2 | 0.538 | 1556.71 |
| | | 3 | 0.498 | 1440.97 |
| | 3 | 1 | 0.297 | 859.38 |
| | | 2 | 0.333 | 963.54 |
| | | 3 | 0.309 | 894.10 |
| NaCl | 1 | 1 | 0.344 | 995.37 |
| | | 2 | 0.339 | 980.90 |
| | | 3 | 0.350 | 1012.73 |
| | 2 | 1 | 0.531 | 1536.46 |
| | | 2 | 0.554 | 1603.01 |
| | | 3 | 0.545 | 1576.97 |
| | 3 | 1 | 0.221 | 639.47 |
| | | 2 | 0.236 | 682.87 |
| | | 3 | 0.225 | 651.04 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4ง (ต่อ) ผลหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย folin-ciocalteu ของเมตาบอลด์
ภายในเซลล์

| สภาวะ | ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสง | ฟีนอลิก($\mu\text{g/ml}$) |
|--------------|---------|-----|------------------|-----------------------------|
| รวม เกลือ | 1 | 1 | 0.166 | 480.32 |
| | | 2 | 0.156 | 451.39 |
| | | 3 | 0.157 | 454.28 |
| | 2 | 1 | 0.210 | 607.64 |
| | | 2 | 0.214 | 619.21 |
| | | 3 | 0.210 | 607.64 |
| | 3 | 1 | 0.245 | 708.91 |
| | | 2 | 0.246 | 711.81 |
| | | 3 | 0.258 | 746.53 |

กราฟมาตรฐานแสดงผลระหว่างค่าความดูดกลืนแสง (A 765)
กับความเข้มข้นของ Gallic acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อราที่นำมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่สภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

Descriptives

Weight

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Static (Isolate 1) | 3 | 1.041833 | 0.0661466 | 0.0381898 | 0.877516 | 1.206151 | 0.9667 | 1.0913 |
| Shaking (Isolate 1) | 3 | 1.839800 | 0.0621443 | 0.0358790 | 1.685425 | 1.994175 | 1.7684 | 1.8817 |
| Static (Isolate 2) | 3 | 0.509367 | 0.0448451 | 0.0258913 | 0.397965 | 0.620768 | 0.4577 | 0.5382 |
| Shaking (Isolate 2) | 3 | 2.248967 | 0.0965726 | 0.0557562 | 2.009067 | 2.488866 | 2.1382 | 2.3155 |
| Static (Isolate 3) | 3 | 0.071833 | 0.0120272 | 0.0069439 | 0.041956 | 0.101711 | 0.0583 | 0.0813 |
| Shaking (Isolate 3) | 3 | 2.769933 | 0.1642451 | 0.0948269 | 2.361926 | 3.177941 | 2.6480 | 2.9567 |
| Total | 18 | 1.413622 | 0.9857610 | 0.2323461 | 0.923415 | 1.903830 | 0.0583 | 2.9567 |

ANOVA

Weight

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 16.426 | 5 | 3.285 | 422.118 | .000 |
| Within Groups | .093 | 12 | .008 | | |
| Total | 16.519 | 17 | | | |

Weight

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | | | |
|---------------------|---------------------|-------------------------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Isolate | | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Duncan ^a | Static (Isolate 3) | 3 | 0.071833 | | | | | |
| | Static (Isolate 2) | 3 | | .509367 | | | | |
| | Static (Isolate 1) | 3 | | | 1.041833 | | | |
| | Shaking (Isolate 1) | 3 | | | | 1.839800 | | |
| | Shaking (Isolate 2) | 3 | | | | | 2.248967 | |
| | Shaking (Isolate 3) | 3 | | | | | | 2.769933 |
| | Sig. | | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. การวิเคราะห์ค่าผลของการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

2.1 Isolate 1

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Extracellular (Static) | 3 | 39.399933 | 0.3515443 | 0.2029642 | 38.526649 | 40.273218 | 39.0032 | 39.6727 |
| Extracellular (Shaking) | 3 | 58.542000 | 2.1589100 | 1.2464473 | 53.178970 | 63.905030 | 56.3352 | 60.6496 |
| Intracellular (Static) | 3 | 7.259200 | 0.6429373 | 0.3712000 | 5.662055 | 8.856345 | 6.5168 | 7.6304 |
| Intracellular (Shaking) | 3 | 8.063500 | 2.5725792 | 1.4852793 | 1.672859 | 14.454141 | 5.0938 | 9.6102 |
| Total | 12 | 28.316158 | 22.7509914 | 6.5676455 | 13.860868 | 42.771449 | 5.0938 | 60.6496 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 5670.052 | 3 | 1890.017 | 639.816 | 0.000 |
| Within Groups | 23.632 | 8 | 2.954 | | |
| Total | 5693.684 | 11 | | | |

% Inhibition

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|----------|-----------|-----------|
| Condition | | N | 1 | 2 | 3 |
| Duncan ^a | Intracellular (Static) | 3 | 7.259200 | | |
| | Intracellular (Shaking) | 3 | 8.063500 | | |
| | Extracellular (Static) | 3 | | 39.399933 | |
| | Extracellular (Shaking) | 3 | | | 58.542000 |
| | Sig. | | 0.582 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.2 Isolate 2

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Extracellular (Static) | 3 | 30.200833 | 1.7545007 | 1.0129615 | -25.842412 | 34.559255 | 28.3660 | 31.8621 |
| Extracellular (Shaking) | 3 | 31.217467 | 1.1627071 | 0.6712892 | 28.329142 | 34.105791 | 30.1513 | 32.4572 |
| Intracellular (Static) | 3 | 1.856067 | 1.1446814 | 0.6608821 | -0.987479 | 4.699613 | 1.1343 | 3.1759 |
| Intracellular (Shaking) | 3 | 2.082867 | 0.2500504 | 0.1443667 | 1.461707 | 2.704026 | 1.9385 | 2.3716 |
| Total | 12 | 16.339308 | 15.0488345 | 4.3442243 | 6.777735 | 25.900882 | 1.1343 | 32.4572 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 2479.536 | 3 | 826.512 | 569.715 | 0.000 |
| Within Groups | 11.606 | 8 | 1.451 | | |
| Total | 2491.142 | 11 | | | |

% Inhibition

| | | Subset for alpha = 0.01 | | |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|----------|-----------|
| Condition | | N | 1 | 2 |
| Duncan ^a | Intracellular (Static) | 3 | 1.856067 | |
| | Intracellular (Shaking) | 3 | 2.082867 | |
| | Extracellular (Static) | 3 | | 30.200833 |
| | Extracellular (Shaking) | 3 | | 31.217467 |
| | Sig. | | 0.823 | .331 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.3 Isolate 3

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Extracellular (Static) | 3 | 34.614433 | 2.7552638 | 1.5907523 | 27.769979 | 41.458888 | 31.7878 | 37.2923 |
| Extracellular (Shaking) | 3 | 45.623600 | 5.0610461 | 2.9219963 | 33.051265 | 58.195935 | 41.7555 | 51.3514 |
| Intracellular (Static) | 3 | 1.175533 | 0.9120714 | .5265847 | -1.090178 | 3.441244 | 0.1444 | 1.8767 |
| Intracellular (Shaking) | 3 | 1.959167 | 0.1988666 | .1148157 | 1.465155 | 2.453179 | 1.8148 | 2.1860 |
| Total | 12 | 20.843183 | 20.6916121 | 5.9731539 | 7.696360 | 33.990006 | 0.1444 | 51.3514 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 4641.417 | 3 | 1547.139 | 181.605 | 0.000 |
| Within Groups | 68.154 | 8 | 8.519 | | |
| Total | 4709.571 | 11 | | | |

% Inhibition

| | | N | Subset for alpha = 0.01 | | |
|---------------------|-------------------------|---|-------------------------|-----------|-----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Duncan ^a | Intracellular (Static) | 3 | 1.175533 | | |
| | Intracellular (Shaking) | 3 | 1.959167 | | |
| | Extracellular (Static) | 3 | | 34.614433 | |
| | Extracellular (Shaking) | 3 | | | 45.623600 |
| | Sig. | | 0.751 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. การวิเคราะห์ค่าผลของการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ และเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ทำการเลี้ยงในสถานะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3.1 Isolate 1

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 339.506173 | 3.3411474 | 1.9290124 | 331.206303 | 347.806043 | 335.6481 | 341.4352 |
| Extracellular (Static) | 3 | 1605.903333 | 18.0688609 | 10.4320617 | 1561.017795 | 1650.788872 | 1585.6500 | 1620.3700 |
| Extracellular (Shaking) | 3 | 1669.560000 | 38.2745725 | 22.0978347 | 1574.480691 | 1764.639309 | 1640.6300 | 1712.9600 |
| Intracellular (Static) | 3 | 706.016667 | 43.6883753 | 25.2234952 | 597.488726 | 814.544607 | 665.5100 | 752.3100 |
| Intracellular (Shaking) | 3 | 653.936667 | 25.2265541 | 14.5645578 | 591.270432 | 716.602901 | 625.0000 | 671.3000 |
| Total | 15 | 994.984568 | 559.4589655 | 144.4516837 | 685.166520 | 1304.802616 | 335.6481 | 1712.9600 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|-------|
| Between Groups | 4373225.390 | 4 | 1093306.348 | 1257.355 | 0.000 |
| Within Groups | 8695.286 | 10 | 869.529 | | |
| Total | 4381920.677 | 14 | | | |

concentration

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|-------------|
| Condition | | N | 1 | 2 | 3 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 339.506173 | | |
| | Intracellular (Shaking) | 3 | | 653.936667 | |
| | Intracellular (Static) | 3 | | 706.016667 | |
| | Extracellular (Static) | 3 | | | 1605.903333 |
| | Extracellular (Shaking) | 3 | | | 1669.560000 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.056 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3.2 Isolate 2

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 339.506173 | 3.3411474 | 1.9290124 | 331.206303 | 347.806043 | 335.6481 | 341.4352 |
| Extracellular (Static) | 3 | 1839.313333 | 7.2783057 | 4.2021317 | 1821.233020 | 1857.393647 | 1831.6000 | 1846.0600 |
| Extracellular (Shaking) | 3 | 2103.590000 | 26.5232935 | 15.3132307 | 2037.702486 | 2169.477514 | 2074.6500 | 2126.7400 |
| Intracellular (Static) | 3 | 679.013333 | 4.4200038 | 2.5518904 | 668.033435 | 689.993231 | 674.1900 | 682.8700 |
| Intracellular (Shaking) | 3 | 600.890000 | 49.2169188 | 28.4154013 | 478.628396 | 723.151604 | 564.2400 | 656.8300 |
| Total | 15 | 1112.462568 | 740.6317165 | 191.2302869 | 702.314394 | 1522.610742 | 335.6481 | 2126.7400 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 7673075.825 | 4 | 1918268.956 | 2988.457 | .000 |
| Within Groups | 6418.927 | 10 | 641.893 | | |
| Total | 7679494.752 | 14 | | | |

Concentration

| | | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---------------------|-------------------------|---|-------------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 339.506173 | | | | |
| | Intracellular (Shaking) | 3 | | 600.890000 | | | |
| | Intracellular (Static) | 3 | | | 679.013333 | | |
| | Extracellular (Static) | 3 | | | | 1839.313333 | |
| | Extracellular (Shaking) | 3 | | | | | 2103.590000 |
| | Sig. | | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3.3 Isolate 3

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 339.506173 | 3.3411474 | 1.9290124 | 331.206303 | 347.806043 | 335.6481 | 341.4352 |
| Extracellular (Static) | 3 | 2087.193333 | 15.9341279 | 9.1995731 | 2047.610765 | 2126.775901 | 2068.8700 | 2097.8000 |
| Extracellular (Shaking) | 3 | 2071.760000 | 12.6144243 | 7.2829413 | 2040.424033 | 2103.095967 | 2063.0800 | 2086.2300 |
| Intracellular (Static) | 3 | 684.800000 | 36.7541181 | 21.2200000 | 593.497709 | 776.102291 | 642.3600 | 706.0200 |
| Intracellular (Shaking) | 3 | 827.546667 | 47.8057124 | 27.6006409 | 708.790694 | 946.302640 | 795.7200 | 882.5200 |
| Total | 15 | 1202.161235 | 759.8444289 | 196.1909879 | 781.373415 | 1622.949054 | 335.6481 | 2097.8000 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|-------|
| Between Groups | 8074968.917 | 4 | 2018742.229 | 2485.870 | 0.000 |
| Within Groups | 8120.869 | 10 | 812.087 | | |
| Total | 8083089.787 | 14 | | | |

| | | Concentration | | | | |
|---------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|------------|------------|-------------|
| | | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
| Condition | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 339.506173 | | | |
| | Intracellular (Static) | 3 | | 684.800000 | | |
| | Intracellular (Shaking) | 3 | | | 827.546667 | |
| | Extracellular (Shaking) | 3 | | | | 2071.760000 |
| | Extracellular (Static) | 3 | | | | 2087.193333 |
| | Sig. | | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4. การวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของราที่นำมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่มีการเติมเกลือแร่เสริมที่แตกต่างกัน

4.1 Isolate 1

Descriptives

Weight

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 1.839800 | 0.0621443 | 0.0358790 | 1.685425 | 1.994175 | 1.7684 | 1.8817 |
| CaCO ₃ | 3 | 2.096200 | 0.0848797 | 0.0490053 | 1.885347 | 2.307053 | 2.0215 | 2.1885 |
| CaCl ₂ | 3 | 2.358333 | 0.0311811 | 0.0180024 | 2.280875 | 2.435792 | 2.3357 | 2.3939 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 1.852867 | 0.0520318 | 0.0300405 | 1.723613 | 1.982121 | 1.8026 | 1.9065 |
| NaCl | 3 | 1.371500 | 0.0460540 | 0.0265893 | 1.257096 | 1.485904 | 1.3204 | 1.4098 |
| Mix | 3 | 1.818033 | 0.0465285 | 0.0268633 | 1.702450 | 1.933617 | 1.7650 | 1.8520 |
| Total | 18 | 1.889456 | 0.3122389 | 0.0735954 | 1.734183 | 2.044728 | 1.3204 | 2.3939 |

ANOVA

Weight

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 1.619 | 5 | 0.324 | 102.101 | 0.000 |
| Within Groups | 0.038 | 12 | 0.003 | | |
| Total | 1.657 | 17 | | | |

Weight

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | Condition | N | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Duncan ^a | NaCl | 3 | 1.371500 | | | |
| | Mix | 3 | | 1.818033 | | |
| | Shaking | 3 | | 1.839800 | | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | 1.852867 | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | 2.096200 | |
| | CaCl ₂ | 3 | | | | 2.358333 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.485 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4.2 Isolate 2

Descriptives

Weight

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 2.248967 | 0.0965726 | 0.0557562 | 2.009067 | 2.488866 | 2.1382 | 2.3155 |
| CaCO ₃ | 3 | 2.483800 | 0.1473681 | 0.0850830 | 2.117717 | 2.849883 | 2.3235 | 2.6134 |
| CaCl ₂ | 3 | 2.472800 | 0.3863650 | 0.2230679 | 1.513016 | 3.432584 | 2.0299 | 2.7407 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 2.205700 | 0.0197949 | 0.0114286 | 2.156527 | 2.254873 | 2.1877 | 2.2269 |
| NaCl | 3 | 2.092533 | 0.0115868 | 0.0066896 | 2.063750 | 2.121316 | 2.0844 | 2.1058 |
| Mix | 3 | 2.464933 | 0.2244670 | 0.1295961 | 1.907326 | 3.022540 | 2.3322 | 2.7241 |
| Total | 18 | 2.328122 | 0.2280847 | 0.0537601 | 2.214698 | 2.441546 | 2.0299 | 2.7407 |

ANOVA

Weight

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.422 | 5 | 0.084 | 2.190 | 0.124 |
| Within Groups | 0.462 | 12 | 0.039 | | |
| Total | 0.884 | 17 | | | |

Weight

| | | | | Subset for alpha = 0.01 |
|---------------------|---------------------------------|---|----------|----------------------------|
| Condition | | N | | 1 |
| Duncan ^a | NaCl | 3 | 2.092533 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | 2.205700 | |
| | Shaking | 3 | 2.248967 | |
| | Mix | 3 | 2.464933 | |
| | CaCl ₂ | 3 | 2.472800 | |
| | CaCO ₃ | 3 | 2.483800 | |
| | Sig. | | | 0.048 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4.3 Isolate 3

Descriptives

Weight

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 2.769933 | 0.1642451 | 0.0948269 | 2.361926 | 3.177941 | 2.6480 | 2.9567 |
| CaCO ₃ | 3 | 2.662067 | 0.1859524 | 0.1073597 | 2.200135 | 3.123998 | 2.5374 | 2.8758 |
| CaCl ₂ | 3 | 2.416000 | 0.1997516 | 0.1153266 | 1.919790 | 2.912210 | 2.2813 | 2.6455 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 1.945500 | 0.0832946 | 0.0480902 | 1.738585 | 2.152415 | 1.8497 | 2.0008 |
| NaCl | 3 | 1.117533 | 0.0537275 | 0.0310196 | 0.984067 | 1.251000 | 1.0591 | 1.1648 |
| Mix | 3 | 2.113633 | 0.0467365 | 0.0269833 | 1.997533 | 2.229733 | 2.0800 | 2.1670 |
| Total | 18 | 2.170778 | 0.5789649 | 0.1364633 | 1.882865 | 2.458690 | 1.0591 | 2.9567 |

ANOVA

Weight

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 5.471 | 5 | 1.094 | 57.866 | .000 |
| Within Groups | 0.227 | 12 | 0.019 | | |
| Total | 5.698 | 17 | | | |

Weight

| | | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---------------------|---------------------------------|---|-------------------------|----------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Duncan ^a | NaCl | 3 | 1.117533 | | | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | 1.945500 | | |
| | Mix | 3 | | 2.113633 | 2.113633 | |
| | CaCl ₂ | 3 | | | 2.416000 | 2.416000 |
| | CaCO ₃ | 3 | | | | 2.662067 |
| | Shaking | 3 | | | | 2.769933 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.160 | 0.020 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. การวิเคราะห์ค่าผลของการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต

5.1 Isolate 1

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 45.747582 | 1.2387797 | 0.7152098 | 42.670283 | 48.824882 | 44.3590 | 46.7394 |
| CaCO ₃ | 3 | 58.145301 | 0.2391185 | 0.1380552 | 57.551298 | 58.739305 | 57.9717 | 58.4181 |
| CaCl ₂ | 3 | 54.525167 | 2.1589124 | 1.2464487 | 49.162132 | 59.888203 | 52.1696 | 56.4096 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 82.717580 | 0.6058414 | 0.3497827 | 81.212587 | 84.222573 | 82.2961 | 83.4119 |
| NaCl | 3 | 63.749070 | 1.5644723 | 0.9032485 | 59.862706 | 67.635435 | 62.1374 | 65.2616 |
| Mix | 3 | 54.376395 | 1.4392038 | 0.8309247 | 50.801214 | 57.951575 | 53.5086 | 56.0377 |
| Total | 18 | 59.876849 | 11.9236448 | 2.8104300 | 53.947360 | 65.806338 | 44.3590 | 83.4119 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 2394.669 | 5 | 478.934 | 257.986 | .000 |
| Within Groups | 22.277 | 12 | 1.856 | | |
| Total | 2416.946 | 17 | | | |

% Inhibition

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Isolate | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Duncan ^a | Shaking | 3 | 45.747582 | | | | |
| | Mix | 3 | | 54.376395 | | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 54.525167 | | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | 58.145301 | | |
| | NaCl | 3 | | | | 63.749070 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | | | 82.717580 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.896 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5.2 Isolate 2

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 31.217456 | 1.1627448 | 0.6713110 | 28.329038 | 34.105874 | 30.1513 | 32.4572 |
| CaCO ₃ | 3 | 4.587167 | 1.5031685 | 0.8678548 | 0.853089 | 8.321244 | 3.2234 | 6.1989 |
| CaCl ₂ | 3 | 28.192413 | 2.2492893 | 1.2986278 | 22.604868 | 33.779957 | 26.2832 | 30.6720 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 6.570791 | 0.2682037 | 0.1548475 | 5.904536 | 7.237046 | 6.3476 | 6.8683 |
| NaCl | 3 | 16.513761 | 1.2093973 | 0.6982459 | 13.509452 | 19.518071 | 15.5715 | 17.8775 |
| Mix | 3 | 28.018845 | 2.6865030 | 1.5510532 | 21.345201 | 34.692488 | 25.4649 | 30.8207 |
| Total | 18 | 19.183405 | 11.0739432 | 2.6101535 | 13.676463 | 24.690348 | 3.2234 | 32.4572 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 2049.902 | 5 | 409.980 | 141.189 | 0.000 |
| Within Groups | 34.845 | 12 | 2.904 | | |
| Total | 2084.748 | 17 | | | |

% Inhibition

| | | N | Subset for alpha = 0.01 | | |
|---------------------|---------------------------------|---|-------------------------|-----------|-----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Duncan ^a | CaCO ₃ | 3 | 4.587167 | | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | 6.570791 | | |
| | NaCl | 3 | | 16.513761 | |
| | Mix | 3 | | | 28.018845 |
| | CaCl ₂ | 3 | | | 28.192413 |
| | Shaking | 3 | | | 31.217456 |
| | Sig. | | 0.179 | 1.000 | 0.048 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5.3 Isolate 3

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 45.623605 | 5.0610033 | 2.9219716 | 33.051376 | 58.195834 | 41.7555 | 51.3514 |
| CaCO ₃ | 3 | 42.201835 | 0.7438631 | 0.4294696 | 40.353976 | 44.049693 | 41.4580 | 42.9457 |
| CaCl | 3 | 19.117282 | 1.1579761 | 0.6685578 | 16.240710 | 21.993855 | 18.0263 | 20.3323 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 67.096454 | 1.8556863 | 1.0713810 | 62.486674 | 71.706235 | 65.7079 | 69.2041 |
| NaCl ₂ | 3 | 54.649145 | 1.1387020 | 0.6574299 | 51.820452 | 57.477837 | 53.3598 | 55.5170 |
| Mix | 3 | 6.868336 | 1.3896510 | 0.8023154 | 3.416252 | 10.320421 | 5.6038 | 8.3561 |
| Total | 18 | 39.259443 | 21.1656450 | 4.9887904 | 28.734015 | 49.784871 | 5.6038 | 69.2041 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 7547.378 | 5 | 1509.476 | 264.980 | 0.000 |
| Within Groups | 68.359 | 12 | 5.697 | | |
| Total | 7615.737 | 17 | | | |

% Inhibition

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Isolate | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Duncan ^a | Mix | 3 | 6.868336 | | | | |
| | CaCl | 3 | | 19.117282 | | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | 42.201835 | | |
| | Shaking | 3 | | | 45.623605 | | |
| | NaCl ₂ | 3 | | | | 54.649145 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | | | 67.096454 |
| | Sig. | | 1.000 | 1.000 | 0.105 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6. การวิเคราะห์ค่าผลของการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเมตาบอลไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต

6.1 Isolate 1

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 8.063518 | 2.5725662 | 1.4852718 | 1.672909 | 14.454127 | 5.0938 | 9.6102 |
| CaCO ₃ | 3 | .659930 | 0.6615391 | 0.3819398 | -0.983424 | 2.303284 | 0.0825 | 1.3817 |
| CaCl ₂ | 3 | 9.342132 | 1.4193827 | 0.8194810 | 5.816190 | 12.868075 | 8.3729 | 10.9713 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 1.093009 | 0.8756805 | 0.5055744 | -1.082302 | 3.268320 | 0.0825 | 1.6292 |
| NaCl | 3 | 4.578264 | 2.8421343 | 1.6409070 | -2.481990 | 11.638517 | 2.1241 | 7.6923 |
| Mix | 3 | 7.259229 | 0.6429555 | 0.3712106 | 5.662039 | 8.856419 | 6.5168 | 7.6304 |
| Total | 18 | 5.166014 | 3.7497185 | 0.8838171 | 3.301322 | 7.030705 | 0.0825 | 10.9713 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 202.370 | 5 | 40.474 | 13.250 | 0.000 |
| Within Groups | 36.657 | 12 | 3.055 | | |
| Total | 239.027 | 17 | | | |

% Inhibition

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|
| | Isolate | N | 1 | 2 | 3 |
| Duncan ^a | CaCO ₃ | 3 | 0.659930 | | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | 1.093009 | | |
| | NaCl | 3 | 4.578264 | 4.578264 | |
| | Mix | 3 | | 7.259229 | 7.259229 |
| | Shaking | 3 | | 8.063518 | 8.063518 |
| | CaCl ₂ | 3 | | | 9.342132 |
| | Sig. | | | 0.022 | 0.038 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6.2 Isolate 2

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 2.082904 | 0.2500383 | 0.1443597 | 1.461774 | 2.704033 | 1.9385 | 2.3716 |
| CaCO ₃ | 3 | 1.093009 | 0.7685974 | 0.4437499 | -0.816293 | 3.002311 | 0.2062 | 1.5673 |
| CaCl ₂ | 3 | 1.464219 | 0.0357198 | 0.0206228 | 1.375487 | 1.552952 | 1.4436 | 1.5055 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 1.361105 | 0.2789802 | 0.1610693 | 0.668080 | 2.054131 | 1.0724 | 1.6292 |
| NaCl | 3 | 2.000412 | 0.3863682 | 0.2230698 | 1.040621 | 2.960204 | 1.5673 | 2.3098 |
| Mix | 3 | 2.392246 | 1.1003771 | 0.6353030 | -0.341242 | 5.125734 | 1.1343 | 3.1759 |
| Total | 18 | 1.732316 | 0.6830295 | 0.1609916 | 1.392653 | 2.071979 | 0.2062 | 3.1759 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 3.746 | 5 | 0.749 | 2.148 | 0.129 |
| Within Groups | 4.185 | 12 | 0.349 | | |
| Total | 7.931 | 17 | | | |

% Inhibition

| | | Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 |
|---------------------|---------------------------------|---------|---|----------------------------|
| | | | | 1 |
| Duncan ^a | CaCO ₃ | | 3 | 1.093009 |
| | Na ₂ CO ₃ | | 3 | 1.361105 |
| | CaCl ₂ | | 3 | 1.464219 |
| | NaCl | | 3 | 2.000412 |
| | Shaking | | 3 | 2.082904 |
| | Mix | | 3 | 2.392246 |
| | Sig. | | | 0.031 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6.3 Isolate 3

Descriptives

% Inhibition

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Shaking | 3 | 1.959167 | 0.1988792 | 0.1148229 | 1.465124 | 2.453210 | 1.8148 | 2.1860 |
| CaCO ₃ | 3 | 0.866158 | 0.6319469 | 0.3648547 | -0.703685 | 2.436001 | 0.1444 | 1.3199 |
| CaCl | 3 | 1.402351 | 0.1287894 | 0.0743566 | 1.082420 | 1.722282 | 1.2580 | 1.5055 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 2.124149 | 1.1187755 | 0.6459253 | -0.655043 | 4.903342 | 1.0724 | 3.2996 |
| NaCl | 3 | 1.010518 | 0.9604563 | 0.5545197 | -1.375388 | 3.396423 | 0.0206 | 1.9385 |
| Mix | 3 | 1.361105 | 0.1287894 | 0.0743566 | 1.041175 | 1.681036 | 1.2580 | 1.5055 |
| Total | 18 | 1.453908 | 0.7302664 | 0.1721254 | 1.090755 | 1.817061 | 0.0206 | 3.2996 |

ANOVA

% Inhibition

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 3.773 | 5 | 0.755 | 1.711 | 0.207 |
| Within Groups | 5.292 | 12 | 0.441 | | |
| Total | 9.066 | 17 | | | |

% Inhibition

| | | Subset for alpha = 0.01 |
|---------------------------------|---|----------------------------|
| Isolate | N | 1 |
| Duncan ^a | | |
| CaCO ₃ | 3 | .866158 |
| NaCl | 3 | 1.010518 |
| Mix | 3 | 1.361105 |
| CaCl | 3 | 1.402351 |
| Shaking | 3 | 1.959167 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 2.124149 |
| Sig. | | 0.058 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7. การวิเคราะห์ค่าผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต

7.1 Isolate 1

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 389.660494 | 11.6940159 | 6.7515432 | 360.610948 | 418.710040 | 376.1574 | 396.4120 |
| Shaking | 3 | 1669.560185 | 38.2776520 | 22.0996127 | 1574.473226 | 1764.647144 | 1640.6250 | 1712.9630 |
| CaCO ₃ | 3 | 1455.439815 | 28.9351850 | 16.7057368 | 1383.560831 | 1527.318799 | 1426.5046 | 1484.3750 |
| CaCl ₂ | 3 | 1276.041667 | 109.9156245 | 63.4598154 | 1002.996119 | 1549.087214 | 1192.1296 | 1400.4630 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 2303.240741 | 39.7793029 | 22.9665912 | 2204.423474 | 2402.058007 | 2259.8380 | 2337.9630 |
| NaCl | 3 | 1467.978395 | 107.6580736 | 62.1564178 | 1200.540914 | 1735.415876 | 1374.4213 | 1585.6481 |
| Mix | 3 | 1683.063272 | 8.3528681 | 4.8225307 | 1662.313597 | 1703.812946 | 1678.2407 | 1692.7083 |
| Total | 21 | 1463.569224 | 548.0920001 | 119.6034799 | 1214.080737 | 1713.057711 | 376.1574 | 2337.9630 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 5952570.728 | 6 | 992095.121 | 250.141 | 0.000 |
| Within Groups | 55526.084 | 14 | 3966.149 | | |
| Total | 6008096.812 | 20 | | | |

Concentration

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Isolate | | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 389.660494 | | | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 1276.041667 | | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | 1455.439815 | | |
| | NaCl | 3 | | | 1467.978395 | | |
| | Shaking | 3 | | | | 1669.560185 | |
| | Mix | 3 | | | | 1683.063272 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | | | 2303.240741 |
| | Sig. | | | 1.000 | 1.000 | 0.811 | 0.797 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7.2 Isolate 2

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 389.660494 | 11.6940159 | 6.7515432 | 360.610948 | 418.710040 | 376.1574 | 396.4120 |
| Shaking | 3 | 2103.587963 | 26.5195351 | 15.3110607 | 2037.709786 | 2169.466140 | 2074.6528 | 2126.7361 |
| CaCO ₃ | 3 | 2146.990741 | 77.8028336 | 44.9194869 | 1953.717788 | 2340.263694 | 2057.2917 | 2196.1806 |
| CaCl ₂ | 3 | 1358.989198 | 37.3177896 | 21.5454358 | 1266.286669 | 1451.691726 | 1328.1250 | 1400.4630 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 1936.728395 | 33.9089427 | 19.5773372 | 1852.493912 | 2020.962878 | 1898.1481 | 1961.8056 |
| NaCl | 3 | 1370.563272 | 21.7174577 | 12.5385800 | 1316.614116 | 1424.512427 | 1348.3796 | 1391.7824 |
| Mix | 3 | 1908.757716 | 10.9546841 | 6.3246898 | 1881.544772 | 1935.970660 | 1901.0417 | 1921.2963 |
| Total | 21 | 1602.182540 | 592.9356344 | 129.3891632 | 1332.281475 | 1872.083605 | 376.1574 | 2196.1806 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 7011398.524 | 6 | 1168566.421 | 815.761 | 0.000 |
| Within Groups | 20054.807 | 14 | 1432.486 | | |
| Total | 7031453.332 | 20 | | | |

concentration

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | Isolate | N | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 389.660494 | | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 1358.989198 | | |
| | NaCl ₂ | 3 | | 1370.563272 | | |
| | Mix | 3 | | | 1908.757716 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | 1936.728395 | |
| | Shaking | 3 | | | | 2103.587963 |
| | CaCO ₃ | 3 | | | | 2146.990741 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.714 | 0.381 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7.3 Isolate 3

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 389.660494 | 11.6940159 | 6.7515432 | 360.610948 | 418.710040 | 376.1574 | 396.4120 |
| Shaking | 3 | 2071.759259 | 12.6125548 | 7.2818619 | 2040.427936 | 2103.090582 | 2063.0787 | 2086.2269 |
| CaCO ₃ | 3 | 1718.750000 | 42.8201639 | 24.7222331 | 1612.378816 | 1825.121184 | 1669.5602 | 1747.6852 |
| CaCl ₂ | 3 | 1237.461420 | 28.3997529 | 16.3966050 | 1166.912523 | 1308.010317 | 1221.0648 | 1270.2546 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 2336.998457 | 22.0996128 | 12.7592174 | 2282.099975 | 2391.896938 | 2317.7083 | 2361.1111 |
| NaCl | 3 | 1222.029321 | 18.6027213 | 10.7402861 | 1175.817599 | 1268.241042 | 1200.8102 | 1235.5324 |
| Mix | 3 | 1624.228395 | 8.8398450 | 5.1036869 | 1602.269002 | 1646.187787 | 1614.5833 | 1631.9444 |
| Total | 21 | 1514.412478 | 608.8003369 | 132.8511251 | 1237.289887 | 1791.535069 | 376.1574 | 2361.1111 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|-------|
| Between Groups | 7405059.932 | 6 | 1234176.655 | 2244.811 | 0.000 |
| Within Groups | 7697.072 | 14 | 549.791 | | |
| Total | 7412757.004 | 20 | | | |

Concentration

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Isolate | | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 389.660494 | | | | | |
| | NaCl | 3 | | 1222.029321 | | | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 1237.461420 | | | | |
| | Mix | 3 | | | 1624.228395 | | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | | 1718.750000 | | |
| | Shaking | 3 | | | | | 2071.759259 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | | | | 2336.998457 |
| | Sig. | | 1.000 | 0.434 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

8. การวิเคราะห์ค่าผลปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนประกอบของเกลือแร่ที่แตกต่างกันของทั้ง 3 ไอโซเลต

8.1 Isolate 1

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|------------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 389.660494 | 11.6940159 | 6.7515432 | 360.610948 | 418.710040 | 376.1574 | 396.4120 |
| Shaking | 3 | 653.935185 | 25.2251096 | 14.5637238 | 591.272539 | 716.597831 | 625.0000 | 671.2963 |
| CaCO ₃ | 3 | 704.089506 | 35.3593803 | 20.4147478 | 616.251936 | 791.927076 | 665.5093 | 734.9537 |
| CaCl ₂ | 3 | 454.282407 | 2.8935185 | 1.6705737 | 447.094509 | 461.470306 | 451.3889 | 457.1759 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 503.472222 | 2.8935185 | 1.6705737 | 496.284324 | 510.660121 | 500.5787 | 506.3657 |
| NaCl | 3 | 996.334876 | 15.9362571 | 9.2008023 | 956.747019 | 1035.922734 | 980.9028 | 1012.7315 |
| Mix | 3 | 461.998457 | 15.9362574 | 9.2008025 | 422.410599 | 501.586315 | 451.3889 | 480.3241 |
| Total | 21 | 594.824735 | 199.8153596 | 43.6032862 | 503.869874 | 685.779597 | 376.1574 | 1012.7315 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 793427.528 | 6 | 132237.921 | 363.289 | 0.000 |
| Within Groups | 5096.031 | 14 | 364.002 | | |
| Total | 798523.559 | 20 | | | |

Concentration

| | | Subset for alpha = 0.01 | | | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Isolate | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 389.660494 | | | | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 454.282407 | | | | |
| | Mix | 3 | | 461.998457 | 461.998457 | | | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | 503.472222 | | | |
| | Shaking | 3 | | | | 653.935185 | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | | | 704.089506 | |
| | NaCl | 3 | | | | | | 996.334876 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.628 | 0.019 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

8.2 Isolate 2

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|-------------|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 389.660494 | 11.6940159 | 6.7515432 | 360.610948 | 418.710040 | 376.1574 | 396.4120 |
| Shaking | 3 | 542.052469 | 101.7405440 | 58.7399305 | 289.314947 | 794.789991 | 462.9630 | 656.8287 |
| CaCO ₃ | 3 | 677.083333 | 13.2597677 | 7.6555304 | 644.144244 | 710.022422 | 662.6157 | 688.6574 |
| CaCl ₂ | 3 | 521.797840 | 8.8398451 | 5.1036869 | 499.838447 | 543.757232 | 512.1528 | 529.5139 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 1485.339506 | 62.4177845 | 36.0369247 | 1330.285134 | 1640.393878 | 1440.9722 | 1556.7130 |
| NaCl | 3 | 1572.145062 | 33.5365330 | 19.3623263 | 1488.835695 | 1655.454428 | 1536.4583 | 1603.0093 |
| Mix | 3 | 611.496914 | 6.6822948 | 3.8580247 | 594.897173 | 628.096654 | 607.6389 | 619.2130 |
| Total | 21 | 828.510802 | 463.7402449 | 101.1964179 | 617.418774 | 1039.602831 | 376.1574 | 1603.0093 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 4269485.926 | 6 | 711580.988 | 315.114 | 0.000 |
| Within Groups | 31614.369 | 14 | 2258.169 | | |
| Total | 4301100.295 | 20 | | | |

concentration

| | | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---------------------|---------------------------------|---|-------------------------|------------|------------|-------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 389.660494 | | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 521.797840 | | |
| | Shaking | 3 | | 542.052469 | | |
| | Mix | 3 | | 611.496914 | 611.496914 | |
| | CaCO ₃ | 3 | | | 677.083333 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | | 1485.339506 |
| | NaCl ₂ | 3 | | | | 1572.145062 |
| | Sig. | | 1.000 | 0.045 | 0.113 | .042 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

8.3 Isolate 3

Descriptives

concentration

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|------------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|----------|----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Control | 3 | 389.660494 | 11.6940159 | 6.7515432 | 360.610948 | 418.710040 | 376.1574 | 396.4120 |
| Shaking | 3 | 827.546296 | 47.8087721 | 27.6024074 | 708.782723 | 946.309870 | 795.7176 | 882.5231 |
| CaCO ₃ | 3 | 585.455247 | 4.4199226 | 2.5518435 | 574.475551 | 596.434943 | 581.5972 | 590.2778 |
| CaCl ₂ | 3 | 658.757716 | 15.9362574 | 9.2008025 | 619.169858 | 698.345574 | 648.1481 | 677.0833 |
| Na ₂ CO ₃ | 3 | 905.671296 | 53.0390706 | 30.6221217 | 773.914941 | 1037.427652 | 859.3750 | 963.5417 |
| NaCl | 3 | 657.793210 | 22.4752705 | 12.9761034 | 601.961543 | 713.624877 | 639.4676 | 682.8704 |
| Mix | 3 | 722.415123 | 20.9322284 | 12.0852277 | 670.416585 | 774.413661 | 708.9120 | 746.5278 |
| Total | 21 | 678.185626 | 161.0691480 | 35.1481697 | 604.867829 | 751.503423 | 376.1574 | 963.5417 |

ANOVA

concentration

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 505960.674 | 6 | 84326.779 | 91.484 | 0.000 |
| Within Groups | 12904.735 | 14 | 921.767 | | |
| Total | 518865.409 | 20 | | | |

concentration

| Isolate | | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---------------------|---------------------------------|---|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Duncan ^a | Control | 3 | 389.660494 | | | | |
| | CaCO ₃ | 3 | | 585.455247 | | | |
| | NaCl | 3 | | 657.793210 | 657.793210 | | |
| | CaCl ₂ | 3 | | 658.757716 | 658.757716 | | |
| | Mix | 3 | | | 722.415123 | | |
| | Shaking | 3 | | | | 827.546296 | |
| | Na ₂ CO ₃ | 3 | | | | | 905.671296 |
| | Sig. | | | 1.000 | 0.013 | 0.026 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารอ้างอิง

- นฤมล พลายงาม . 2540. คุณลักษณะและสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของ *Cordyceps pseudomilitaris* 4671. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพมหานคร
สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2553. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
พิมพ์ครั้งที่ 3 ฉบับปรับปรุง : 98-99
- สุณิษา พลรักษ์ และวิไลลักษณ์ วะโซโน. 2557. การคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่สามารถย่อย
แป้งมันสำปะหลังจากตัวอย่างมันสำปะหลังตากแห้ง และดิน. ภาควิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน
- Boumaaza B, Benkhelifa M, Belkhouja M. 2015. Effects of two salts compounds on
mycelial growth, sporulation, and spore germination of six isolates of *Botrytis
cinerea* in the western north of Algeria. *International journal of microbiology*
2015
- Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A. 2005. Halotolerant and halophilic
fungi and their extrolite production. *Adaptation to Life at High Salt
Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* 9: 427
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. 2004. Mycotoxins, drugs and other
extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol*
49: 201-41
- Hwang H-J, Kim S-W, Choi J-W, Yun J-W. 2003. Production and characterization of
exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190.
Enzyme and Microbial Technology 33: 309-19
- Khiralla A, Mohamed I, Thomas J, Mignard B, Spina R, et al. 2015. A pilot study of
antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal
plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 8: 701-04
- Matsuda Y, Sugiyama F, Nakanishi K, Ito S-i. 2006. Effects of sodium chloride on growth
of ectomycorrhizal fungal isolates in culture. *Mycoscience* 47: 212-17
- POLSIRI K. 2015. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *PLUCHEA INDICA* LESS. EXTRACT AFTER IN
VITRO DIGESTION AND ABSORPTION BY CACO-2 CELL LINE. BURAPHA UNIVERSITY