

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก
ที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF CRUDE
POLYSACCHARIDES FROM MICROALGAE AGAINST
FOODBORNE PATHOGEN



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่สามารถนำออกนอกระบบได้ หากมีข้อสงสัย กรุณาติดต่อฝ่ายบริการลูกค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเอกสารฉบับนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ปีการศึกษา 2561

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF CRUDE
POLYSACCHARIDES FROM MICROALGAE AGAINST
FOODBORNE PATHOGEN



KANOKWAN TALPETCH
NATTIDA CHONJOHO
VORAPARN NITIKARN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ **ACADEMIC YEAR 2561** อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ ตาลเพชร	รหัสนักศึกษา 58050853
	นางสาวณัฐธิดา ขอนจ่อหอ	รหัสนักศึกษา 58050883
	นางสาววรรณพร นิติการ	รหัสนักศึกษา 58050966
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.วีณา ชูโชติ	

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร พบว่า *Chlorella* sp. C4-62 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด 26.297 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละ 2.63 รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. LT-62 และ *Chlorella* sp. SA-62 ร้อยละ 2.15 และ 1.96 ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Chlorella* sp. LT-62 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *E. coli* ATCC 1261 และ *S. Typhimurium* DMST 0562 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.9-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *Chlorella* sp. T2-61 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *L. monocytogenes* DMST 11256 และ *E. coli* ATCC 1261 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.8-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *Chlamydomonas* sp. JU-62 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764 และ *B. cereus* TISTR 5040 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.8-0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลัสแอมเพอโรเมทริก (HPAEC-PAD) พบว่า *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlorella* sp. LT-62 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 14.76 และ 9.12 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

คำสำคัญ : พอลิแซ็กคาไรด์ สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella Chlamydomonas* ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antimicrobial activities of crude polysaccharides from microalgae against foodborne pathogen.
Students	Miss Kanokwan Talpetch Student ID 58050853 Miss Nattida Chonjoho Student ID 58050883 Miss Voraparn Nitikarn Student ID 5800966
Degree	Bachelor of Science (Industrial microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2561
Advisor	Asst.Prof. Weena Choochott

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the antimicrobial activities of crude polysaccharide from microalgae against foodborne pathogen. The highest content of cude polysaccharides from *Chlorella* sp. C4-62 was 26.297 ± 0.05 mg mL⁻¹ with % yield of 2.63%, followed by *Chlorella* sp. LT-62 and *Chlorella* sp. SA-62 were 2.15% and 1.96%, respectively. The evaluation of antimicrobial activity against foodborne pathogen, It was found that crude polysaccharide from *Chlorella* sp. LT-62 inhibited the growth of *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *E. coli* ATCC 1261 and *S. Typhimurium* DMST 0562 at MIC 0.9-1 mg mL⁻¹. *Chlorella* sp. T2-61 inhibited the growth of *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *L. monocytogenes* DMST 11256 and *E. coli* ATCC 1261 at MIC 0.8-1 mg mL⁻¹ and *Chlamydomonas* sp. JU-62 inhibited the growth of *S. aureus* TISTR 764 and *B. cereus* TISTR 5040 at MIC 0.8-0.9 mg mL⁻¹. Analysis of monosaccharide composition of crude polysaccharide with High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD), the result showed that *Chlorella* sp. T2-61 and *Chlorella* sp. LT-62 contained glucose at 14.76% and 9.12% (w/w), respectively.

Keywords : Polysaccharide, Microalgae, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, Antimicrobial activities, Foodborne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผศ.วีณา ชูโชติ ผู้ให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรูปเล่ม ชี้แนะและแก้ไขข้อผิดพลาด ทำให้โครงการพิเศษนี้สมบูรณ์ด้วยดี ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการ รศ.ดร. จิตติ ท่าไว และกรรมการ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจทาน และพิจารณาโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุรีย นานาสมบัติ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เชื่อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการทดลอง และให้คำแนะนำระหว่างการดำเนินการ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำตลอดการศึกษา รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณบิดา มารดา และผู้มีอุปการะคุณทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำโครงการพิเศษ



กนกวรรณ ตาลเพชร
ณัฐธิดา ชอนจ่อหอ
วรพรรณ นิตินการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สำหรับขนาดเล็ก.....	3
2.2 สำหรับสีเขียว.....	3
2.2.1 <i>Scenedesmus</i> sp.	4
2.2.2 <i>Chlamydomonas</i> sp.	5
2.2.3 <i>Chlorella</i> sp.	6
2.3 พอลิแซ็กคาไรด์.....	7
2.4 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย.....	8
2.4.1 การสกัดเย็น.....	8
2.4.2 การสกัดร้อน.....	8
2.4.3 การสกัดด้วยน้ำร้อนร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก.....	8
2.4.4 การสกัดด้วยตัวทำละลาย.....	8
2.4.4.1 การสกัดด้วยเอทานอล.....	8
2.4.4.2 การสกัดด้วยอีทีเอ.....	9
2.5 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร.....	9
2.5.1 เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.5.2 เชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	10
2.5.3 เชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.5.4 เชื้อ <i>Escherichia coli</i>	13
2.5.5 เชื้อ <i>Salmonella</i> spp.	14
2.5.5.1 เชื้อ <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	15
2.6 วิธีการประเมินฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง.....	16
2.6.1 วิธี Disk diffusion.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้
 2.6.1 วิธี Disk diffusion..... 17
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
2.6.2 วิธี Dilution susceptibility test	17
2.6.2.1 วิธี Broth dilution test	18
2.7 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	18
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	19
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
3.1 สารเคมี	23
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	23
3.3 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กทั้งหมดที่ใช้ศึกษา	24
3.4 วิธีการดำเนินงาน	25
3.4.1 คัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ	25
3.4.2 การศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก	25
3.4.3 สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์แบบหยาบ	26
3.4.4 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร	28
3.4.4.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียและอาหารที่ใช้ทดสอบ	28
3.4.4.2 ประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารด้วยวิธี Disk diffusion	29
3.4.4.3 ประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารด้วยวิธี Broth microdilution	30
3.4.4.3.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้	30
3.4.4.3.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้	31
3.4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ จากสาหร่ายขนาดเล็ก	31
3.4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	33
4.1 ผลการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก	33
4.2 ผลการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก	33
4.3 ผลการสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก	40
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
4.4.1 การประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Disk diffusion	41
4.4.2 การประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Broth microdilution.....	44
4.5 ผลการวิเคราะห์หองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	49
5.1 สรุปผล.....	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ก.....	63
ภาคผนวก ข.....	65
ภาคผนวก ค.....	68
ภาคผนวก ง.....	70
ภาคผนวก จ.....	78
ภาคผนวก ฉ.....	81



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ต่างๆ.....	19
2.2 แสดงองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ต่างๆ.....	20
3.1 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.).....	24
3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารที่ใช้ทดสอบ.....	28
4.1 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์.....	34
4.2 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ เมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่.....	38
4.3 น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และร้อยละผลผลิตที่ได้	40
4.4 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์ ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น ด้วยวิธี Disk diffusion.....	43
4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Broth microdilution.....	4
4.6 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์.....	48



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Scenedesmus</i> sp.....	4
2.2 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Chlamydomonas</i> sp.....	5
2.3 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp.....	6
2.4 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.5 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Bacillus cereus</i>	10
2.6 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.7 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Escherichia coli</i>	13
2.8 แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Salmonella</i> spp.....	14
2.9 แสดงตัวอย่างการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยวิธี Agar disk diffusion.....	17
2.10 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	18
3.1 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในถังปริมาตร 6 ลิตร	26
3.2 ผงสาหร่ายที่ได้จากการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	26
3.3 ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน	27
3.4 แสดงผงพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	27
3.5 แสดงแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดแกรมบวก (a) <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 764 (b) <i>Bacillus cereus</i> TISTR 5040 และ (c) <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 11256 กำลังขยาย 1,000 เท่า	28
3.6 แสดงแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดแกรมลบ (d) <i>Escherichia coli</i> ATCC 1261 และ (e) <i>Salmonella</i> Typhimurium DMST 0562 กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	28
3.7 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ค่า MIC ในถาดหลุม ขนาด 96 หลุม.	30
4.1 กราฟแสดงเจริญเติบโตของสาหร่าย (a) ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ (b) จำนวนเซลล์ของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ และ (c) น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. T1-61, <i>Chlorella</i> sp. T2-61, <i>Chlorella</i> sp. LT-62, <i>Chlorella</i> sp. BP-62, <i>Chlorella</i> sp. SA-62, <i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62, <i>Scenedesmus</i> sp. AJ-62, <i>Chlorella</i> sp. C4-62.....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหาร เป็นปัจจัยหลักในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ถ้าหากได้รับประทานอาหารที่ไม่ปลอดภัย มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จะทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ต่างๆได้ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีไข้ และหากมีการขาดน้ำรุนแรงและช็อคร่วมด้วย อาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อมากที่สุด คือ แบคทีเรีย (ร้อยละ 48) รองลงมาได้แก่ ไวรัส และปรสิต ตามลำดับ (ศนิ, 2560) การบริโภคอาหารที่มีความปลอดภัย ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการใช้สารเคมีเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่า สารกันเสีย หรือสารกันบูด แต่ในขณะเดียวสารกันเสียที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ที่ผสมลงในเนื้อสัตว์และอาหารแปรรูป เช่น เนื้อเค็ม แหนม กุนเชียง ไส้กรอก แยม เป็นต้น เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณมากหรือมีการสะสมอย่างต่อเนื่อง สารประกอบไนไตรต์จะรวมตัวกับฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ในเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดภาวะเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ในเลือด ซึ่งจะมีอาการอ่อนเพลีย คลื่นไส้ หายใจไม่ออก ตัวเขียว หัวใจเต้นเร็ว เป็นลม และหมดสติในที่สุด อีกทั้งยังก่อให้เกิดพิษเรื้อรัง เนื่องจากสารประกอบไนไตรต์จะทำปฏิกิริยากับสารประกอบเอมีนในอาหาร ร่วมกับสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร กลายเป็นสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่อวัยวะภายใน (พรณพิสุทธิ์, 2559 ; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2561) หรือการใช้โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate) ในการถนอมอาหาร เช่น น้ำผลไม้ ซอส ผักดอง แยม และน้ำอัดลม เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา การวิจัยของ Gardner and Lawrence (1993) แสดงให้เห็นว่ากรดเบนโซอิกจะทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกในน้ำอัดลมและน้ำผลไม้ เกิดการก่อตัวของเบนซีน โดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเบนซีนเป็นสารก่อมะเร็งอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นการใช้สารเคมีเหล่านี้ในการถนอมอาหาร หรือเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายในระยะยาว

เนื่องจากการศึกษาในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับสารสกัดหยาบของพอลิแซ็กคาไรด์จากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายขนาดเล็ก เช่น *Phormidium versicolor* จากสาธารณรัฐตุนิเซีย ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* ได้ดี นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Quan et al., 2015 ; Belhaj et al., 2017) โดยสารพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากคาร์โบไฮเดรตหลายๆ หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี โดยเฉพาะการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษ พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และมีความเป็นพิษต่ำ ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์จึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางและเป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่มีประโยชน์ และไม่มีความเป็นพิษทั้งต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม (Liu et al., 2015 ; Gupta et al., 2013 ; Rastogi and Sinha, 2009) ด้วยเหตุนี้พวกเราจึงมีความ

สนใจที่จะศึกษาความสามารถของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ที่สามารถยับยั้งการไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร เพื่อพัฒนาเป็นสารกันเสีย เพื่อช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาและการวางจำหน่าย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กสำหรับสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยใช้วิธี Disk diffusion
2. ศึกษาฤทธิ์ และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ จากสาหร่ายขนาดเล็กที่ถูกคัดเลือก ด้วยวิธี Broth microdilution
3. ศึกษาองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร เช่น อาหารสูตร BG-11 และ N-8 จากนั้นทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Disk diffusion และศึกษาหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ เช่น *Staphylococcus aureus* TISTR 764, *Escherichia coli* ATCC 1261, *Salmonella Typhimurium* DMST 0562, *Bacillus cereus* TISTR 5040, *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ด้วยวิธี Broth microdilution จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร
2. ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้แทนสารกันเสียจากสารเคมี
3. ทราบถึงองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นพืชชั้นต่ำที่ไม่มีระบบท่อลำเลียง ท่ออาหาร มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นชัดเจนด้วยตาเปล่า ต้องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง การดำรงชีพเป็นแบบพึ่งตนเอง โดยการผลิตสารอาหารและพลังงาน ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง บริเวณที่พบสาหร่ายขนาดเล็กคือแหล่งน้ำที่มีสีเขียว พื้นดินแฉะ บนผิวใบไม้ ต้นไม้ ร่องน้ำ หรือพื้นผนัง ที่มีความชื้นสูง สาหร่ายขนาดเล็กชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (Colony) จึงพบเห็นในลักษณะเป็นแผ่นสีเขียวสด หรือสีเขียวคล้ำ บางครั้งมีลักษณะเป็นเมือกลื่นๆ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นทรัพยากรชีวภาพ (Bioresource) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากได้ ตามความต้องการและมีศักยภาพในการนำมาเป็นวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อผลิตสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด เพราะภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กมีสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีคุณค่าในเชิงพาณิชย์สูงอยู่มากมาย ได้แก่ กรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน เกลือแร่ รังควัตถุหรือสีธรรมชาติ และสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

สาหร่ายขนาดเล็ก จึงหมายถึงสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นพืชชั้นต่ำที่ไม่มีส่วนราก ลำต้นและใบที่แท้จริง มีขนาดตั้งแต่เล็กมาก มีเซลล์เดียว ไปจนถึงขนาดใหญ่ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก อาจเป็นเส้นสายหรือลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง ซึ่งดูเหมือนราก ลำต้น และใบ ซึ่งรวมเรียกว่า ทาลัส (Thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสงอาศัยอยู่ในน้ำหรือบริเวณที่มีความชื้นสูง จัดเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่สำคัญที่สุดในระบบนิเวศทางน้ำ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายทั้งบริโภคโดยตรงและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ สาหร่ายมีรงควัตถุหลัก 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และไฟโคบิลิน (Phycobilin) ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) (เสวานิตย์ และพัชรี, 2551)

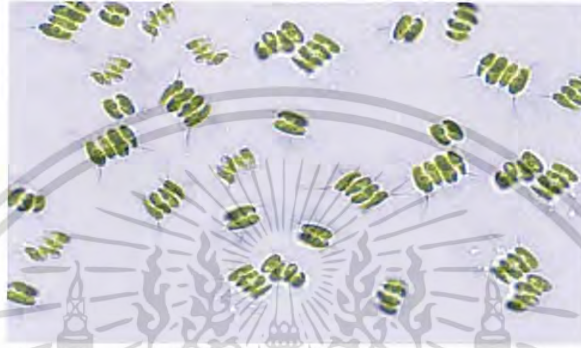
2.2 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) อยู่ในกลุ่มโพรทิสต์ที่สามารถสังเคราะห์อาหารได้โดยการสังเคราะห์แสง (Photoautotrophic) สาหร่ายสีเขียวอาศัยอยู่ในระบบนิเวศและมีความหลากหลายของรูปร่าง ขนาด จากมุมมองทางอนุกรมวิธาน สาหร่ายสีเขียวจะประกอบด้วยกลุ่มพาราไฟเลติก (Paraphyletic) เนื่องจากมีบรรพบุรุษร่วมกับพืช เช่น มีรงควัตถุ และผลิตคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกัน ในระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นเดียวกับพืชบก (Flores and Barone, 2009) สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่มีสีเขียวสด เหมือนสีใบไม้ เนื่องจากในเซลล์มีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ เอ และ บี มากกว่ารงควัตถุชนิดอื่น รงควัตถุทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งในสาหร่ายกลุ่มนี้มีรูปร่างของคลอโรพลาสต์ที่แตกต่างกันมาก และสามารถใช้รูปร่างของคลอโรพลาสต์ในการจำแนกชนิดได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีเขียวมีสมาชิกทั้งหมดราว 450 สกุล 7,500 ชนิด โดยประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาหร่ายทะเล ส่วนที่เหลือซึ่งเป็นส่วนใหญ่จะพบได้ในแหล่งน้ำจืด นอกจากนี้ยังสามารถพบสาหร่ายสีเขียวได้บนบกหรือเรียกว่าเทอเรสเทรียล แอลจี (Terrestrial algae) สาหร่ายสีเขียวบางชนิดจะดำรงชีวิตบนหรือในสาหร่ายและในพืชชนิดอื่น เรียกกลุ่มนี้ว่า อีพิไฟต์ แอลจี (Epiphyte) หรือ เอนโดไฟต์ แอลจี (Endophyte algae) (ปริญาญา และอมรรรัตน์, 2559)

2.2.1 *Scenedesmus* sp.



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Scenedesmus* sp.

(ที่มา: https://www.researchgate.net/figure/Freshwater-green-microalga-Scenedesmus-sp-Chlorococcales-Scenedesmaceae-producing_fig4_8190811)

อนุกรมวิธาน (Guiry, 2002)

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Sphaeropleales (Chlorococcales)

Family Scenedesmaceae

Genus *Scenedesmus*

โคโลนีประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2 4 8 หรือ 16 เซลล์ มาเรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่หรือทรงกระบอกหรือพระจันทร์ครึ่งซีก เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (Spine) ยื่นออกมา บางชนิดก็ไม่มีคลอโรพลาสต์เป็นแผ่นเต็มเซลล์มีไพล์นอยด์และนิวเคลียสเซลล์ละ 1 อันเท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์ของแม่ จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการเอกสาร์สร้างแกมีทที่มีแฟลเจลลัม 2 เส้น แล้วมีการรวมกันแบบไอโซแกมี (Maipsae, 2017) ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scenedesmus พบได้ทั่วไปในน้ำจืด และน้ำเค็ม โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่มีความอุดมสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเสียและมักใช้เป็นตัวชี้วัดมลพิษได้ (Phinyo *et al.*, 2017) *Scenedesmus* มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ และในแต่ละสปีชีส์มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง และเจริญสภาวะที่เป็นกรดแตกต่างกันด้วย (Guiry, 2002)

2.2.2 *Chlamydomonas* sp.

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Chlamydomonas* sp.

(ที่มา : http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/unicells/flagellated/CHLAMYDOMONAS/Chlamydomonas_image_page.html)

อนุกรมวิธาน (Guiry, 2002)

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlamydomonadales

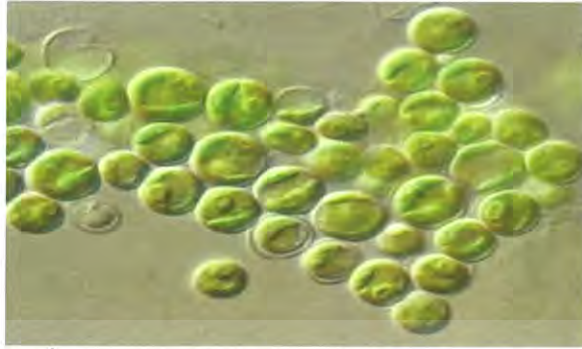
Family Chlamydomonadaceae

Genus *Chlamydomonas*

Chlamydomonas เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่มีสกุลขนาดใหญ่ อาศัยอยู่ในน้ำนิ่งและบนดินชื้น สามารถพบได้ในน้ำจืด น้ำทะเล และแม้กระทั่งหิมะซึ่งถือว่าเป็นสาหร่ายชนิดนี้เป็นสาหร่ายหิมะ (Snow algae) ผนังเซลล์เป็นไกลโคไพรตีน มีแฟลกเจลลา 2 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีนิวเคลียสอยู่ใกล้คลอโรพลาสต์ที่เป็นรูปถ้วย มีไพร์นอยด์ 1 อันที่มีขนาดใหญ่มีหน้าที่ไว้สำหรับสะสมแป้งที่ได้จากการสังเคราะห์แสง แวลคิวโอล (Vacuoles) มีขนาดเล็ก 2 อัน ซึ่งมีหน้าที่ในการขับถ่ายอยู่ใกล้กับแฟลกเจลลา นอกจากนี้ยังมีเซลล์จุดตาสีแดงซึ่งไวต่อแสงทำให้เซลล์สามารถว่ายน้ำเข้าหาแสงได้ (Guiry, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สาหร่าย *Chlorella* sp.



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp.

(ที่มา: https://www.researchgate.net/figure/Microscope-image-of-Chlorellasp_fig8_299466154)

อนุกรมวิธาน

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียว มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-10 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลา รูปร่างกลมหรือรี ผนังค่อนข้างบาง มีรงควัตถุที่ช่วยสังเคราะห์แสงคือคลอโรฟิลล์ เอ และ บี โดยจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปถ้วยหรือเป็นแผ่นอยู่ริมเซลล์ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ (Autospore) มีจำนวน 4 8 หรือ 16 เซลล์สาหร่ายชนิดนี้พบทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เจริญเติบโตง่าย และมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 40 ถึง 50 (ศิริภรณ์ และรูปน, 2553)

สาหร่าย *Chlorella* sp. พบในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป และมีความสำคัญต่อระบบนิเวศในด้านเป็นผู้ผลิตลำดับแรกของห่วงโซ่อาหาร การนำสาหร่าย *Chlorella* sp. มาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่จะใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์และเป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา และหอยสองฝา นอกจากนี้ยังใช้เป็นอาหารของไรแดงและแพลงก์ตอนสัตว์ เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella* sp. มีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถผลิตโปรตีน วิตามิน สารเคมีอื่นๆ และไม่ทำให้น้ำเสีย นอกจากนี้ยังพบว่า *Chlorella vulgaris* สามารถสร้างสารต้านแบคทีเรีย สารต้านไวรัส สารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง สามารถสร้างสารสีกาโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง (วีณา, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 พอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทั้งที่เป็นชนิดเดียวกัน หรืออาจมากกว่าหนึ่งชนิด จำนวนหลายๆ โมเลกุล ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไป เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์เป็นสายยาว ซึ่งอาจมีการแตกแขนงหรือไม่ก็ได้ เป็นสารประกอบที่ไม่มีสี และไม่มีรสหวาน โดยส่วนมากมักมีมวลโมเลกุลสูง มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรคอลลอยด์ สามารถคูดน้ำได้ดี โดยพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดสามารถละลายน้ำได้และมีความหนืด ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันตามโครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ตำแหน่งของพันธะไกลโคไซด์ และลักษณะของสายพอลิเมอร์ เช่น แบบสายตรง (Linear) และแบบแตกแขนง (Branch) โดยโครงสร้างที่แตกต่างกันนี้จะมีผลทำให้พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีฟังก์ชัน หรือการทำงานทางชีวภาพที่แตกต่างกัน (ธิดารัตน์, 2552)

ประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์แบ่งตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ 2 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น ไกลโคเจน (Glycogen) และเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งเมื่อถูกย่อยสลายจะให้น้ำตาลกลูโคส (D-glucose) เพียงอย่างเดียว

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ ชนิดมาต่อกัน และมักจะพบน้ำตาลอะมิโน (Amino sugar) รวมอยู่ด้วย จึงอาจเรียกว่าเป็น ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan ; GAGs) หรือมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (Mucopolysaccharides) ซึ่งจะประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาล 2 ชนิดสลับกัน และเรียงต่อกันซ้ำๆ โดยส่วนมากจะเป็นน้ำตาลอะมิโน ซึ่งอาจจะมีหมู่ซัลเฟต (Sulfate) หรือไม่ก็ได้ และกรดยูโรนิก (Uronic acids) เช่น กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) (Hernandez, 2008)

ในปัจจุบันสารพอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ทั้งจากธรรมชาติ และการสังเคราะห์ขึ้น แต่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นมีโครงสร้าง และคุณสมบัติหลากหลาย และสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากสาหร่ายทะเล (Seaweed extracts) เช่น คาราจีแนน (Carrageenan) วุ้น (Agar) เฟอเซลล์แลน และอัลจินต ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถจำแนกได้ 3 แบบ ดังนี้

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular polysaccharides) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะสร้างอยู่ภายในเซลล์ โดยบางส่วนจะรวมอยู่เป็นส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) และทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารจำพวกคาร์บอน หรือแหล่งสะสมพลังงานของเซลล์

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ (Structural polysaccharides) เป็นองค์ประกอบที่แทรกอยู่ในผนังเซลล์ และในบางกรณีอาจรวมตัวกับส่วนประกอบอื่น เช่น ลิพิด กลายเป็นลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharides) และรวมกับพอลิเปปไทด์เป็นเพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) เป็นต้น

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (Extracellular polysaccharides: EPS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของ King Fahd University of Petroleum & Minerals. เมื่อท่านได้เห็นว่าเว็บไซต์นี้เป็นการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหนียวคล้ายเจล เคลือบหรือปกคลุมเซลล์ โดยมักจะทำให้โคโลนีมีเมือกเยิ้ม หรือบางชนิดสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกมาละลายในอาหารเหลว ทำให้อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นหนืด (ธิดารัตน์, 2552)

สาหร่ายจัดเป็นแหล่งของใยอาหาร (ร้อยละ 25–75) ที่อุดมไปด้วยเส้นใยที่ละลายน้ำได้หรือที่เรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 50–85 ของเซลล์ พอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายสามารถพบได้ทั้งในโครงสร้างของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ เป็นต้น รวมถึงเป็นส่วนประกอบที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น พอร์ไฟแรน (Porphyran) ซึ่งจัดเป็นมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบบริเวณช่องว่างภายในเซลล์ของสาหร่าย นอกจากนี้สาหร่ายบางชนิดก็สามารถปลดปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ได้ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายสีเขียว ส่วนใหญ่เป็นสารอัลแวน (Ulvan) ซึ่งประกอบด้วยกรดซัลฟิวริก ซัลเฟตกาแลคแตน และไซแลน พอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) เป็นสารประเภทวุ้นและคาราจีแนน ส่วนสาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จำพวกอัลจินेट (ประกอบด้วยกรดอัลจินิก) ลามิเนต (ประกอบด้วยสารจำพวกกลูแคน) พุกคอยแดน (มีสารพวกซัลเฟตฟูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก) และเซลลูโลส (Kraan, 2012)

2.4 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย

2.4.1 สกัดน้ำเย็น

การสกัดน้ำเย็น (Cold water extraction) โดยสกัดสาหร่ายในน้ำกลั่น ใช้อัตราส่วนของสาหร่าย:น้ำกลั่นเท่ากับ 1:30 ตั้งบนเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำกากที่แยกได้ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหย (Rotary evaporator) และนำไปแยกสารผ่านเยื่อ (Dialysis) ในน้ำกลั่น เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dryers)

2.4.2 สกัดน้ำร้อน

การสกัดน้ำร้อน (Hot water extraction) โดยนำสาหร่ายมาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนของสาหร่าย:น้ำกลั่น เท่ากับ 1:30 และนำไปสกัดด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองแยกตะกอนออก และสกัดกากซ้ำอีก 2 รอบ นำสารละลายที่สกัดได้มาทำแบบเดียวกันกับการสกัดเย็น (อนุชา และคณะ, 2550)

2.4.3 สกัดด้วยน้ำร้อนร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิค

เทคนิคการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasonic assisted hot water extraction) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด โดยอาศัยหลักการควาเวชันที่เกิดขึ้นในตัวกลางที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิคทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยายที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ ส่งผลให้อัตราการสกัดเร็วขึ้นและเวลาในการสกัดลดลงทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลสาร (Mass transfer) (ณรงค์พันธุ์, 2557; สมเกียรติ และคณะ, 2557)

2.4.4 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

2.4.4.1 การสกัดด้วยเอทานอล

นำผงสาหร่าย มาสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 (โดยปริมาตร) โดยใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำการสกัด 2 ครั้ง โดยใช้ เวลาในการสกัด 3 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิริก (ค้ำไม่ จากนั้นนำไปแยกสารผ่านเยื่อเพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ ในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21

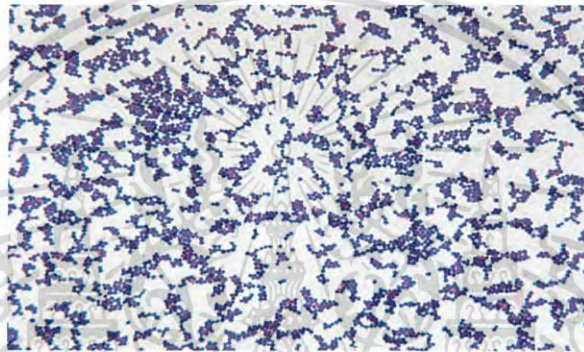
องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสแล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

2.4.4.2 การสกัดด้วยอีดีทีเอ

วิธีการสกัดเหมือนกับการสกัดด้วยเอทานอลแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 0.1 โมลาร์อีดีทีเอ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้อีดีทีเอ 40 มิลลิลิตรต่อกรัมสำหรับแห้ง มีรายงานพบว่าส่วนใหญ่การใช้น้ำร้อนสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและอีดีทีเอ (นารินทร์ และคณะ, 2549)

2.5 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

2.5.1 เชื้อ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Staphylococcus aureus*

(ที่มา: <https://www.sciencephoto.com/media/12864/view/staphylococcus-aureus-bacteria>)

อนุกรมวิธาน (Todar, 2008)

Kingdom Eubacteria

Phylum Firmucutes

Class Bacilli

Order Bacillales

Family Staphylococcaceae

Genus *Staphylococcus*

Species *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในบริเวณผิวหนัง เยื่อของคน และพบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ถ้าร่างกายมีความผิดปกติเกิดขึ้น เช่น เกิดบาดแผลบริเวณผิวหนังที่ภูมิคุ้มกันอ่อนแอ หรือแผลจากการผ่าตัด เชื้อก็จะบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นใน และเข้าสู่กระแสเลือด แพร่กระจายไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกายและก่อให้เกิดโรคได้ บางสายพันธุ์ผลิตสารพิษที่ เรียกว่า เอนเทอโรท็อกซิน (Enterotoxin) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สารพิษภายในเซลล์ที่ผลิตมีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษบ่อย คือ ชนิดเอ และดี โดยช่วงอุณหภูมิที่เชื้อผลิต

เอนเทอโรท็อกซินอยู่ระหว่าง 15.6 และ 46.1 องศาเซลเซียส และผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 40

องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูล ทำให้โคโลนีเป็นเมือก (Slime) ซึ่งจะช่วยให้เชื้อมีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกาย

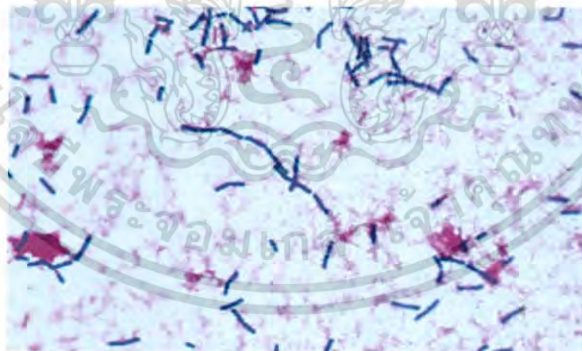
ลักษณะของเชื้อ

Staphylococcus aureus จัดอยู่ในตระกูล Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นวงกลม จัดเรียงตัวคล้ายพวงอุ้งน โคโลนีเป็นสีเหลืองทอง การเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็งมีลักษณะกลม เรียบขุ่นและหนูนเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-4 มิลลิเมตร สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี อาจมีชีวิตรอดได้ในหนองหรือเสมหะแห้งเป็นเวลานาน

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ

อาหารเป็นพิษ (*Staphylococcal food poisoning*) เกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรท็อกซินที่สร้างโดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* เข้าไปในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม จะสามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร 100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหาร หลังจากได้รับเอนเทอโรท็อกซินของ *Staphylococcus aureus* ภายใน 1-6 ชั่วโมง จะเกิดอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน และเป็นตะคริว อาเจียนอย่างรุนแรง มักไม่มีอาการไข้ ปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ อุจจาระร่วง ปวดศีรษะ เหงื่อออก หนาวสั่น ในรายที่รุนแรงอาจช็อค หรือมีมูกและเลือดปนในอุจจาระ แต่ส่วนใหญ่อาการจะหายเป็นปกติภายใน 1-3 วัน หลังจากขับถ่ายเอาเชื้อและสารพิษออกไปหมดแล้ว ถ้าเกิดในเด็กเล็ก และผู้สูงอายุอาการอาจรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ เมื่อได้รับประทานอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อน (นงลักษณ์, 2544)

2.5.2 เชื้อ *Bacillus cereus*



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Bacillus cereus*

(ที่มา: <https://cmr.asm.org/content/23/2/382/figures-only>)

อนุกรมวิธาน (Salaba, 2013)

Kingdom Eubacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Bacillales

Family Bacillaceae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัด Family Bacillaceae อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genus *Bacillus*Species *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่พบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารเป็นจำนวนมาก โดยสามารถพบได้ทั่วไปในอากาศหรือดิน ในส่วนของการปนเปื้อนในอาหารนั้น มักจะพบการปนเปื้อนในอาหารที่มีโปรตีนสูงจำพวกเนื้อสัตว์ นม และไข่ เช่น ขนมไส้สังขยาหรือวานิลลาสอดไส้ครีม เป็นต้น และยังสามารถพบการปนเปื้อนได้ในของแห้ง เช่น ธัญพืช แป้ง และเครื่องเทศ การที่พบ *Bacillus cereus* มีการปนเปื้อนในอาหารมาก อาจเนื่องจากเชื้อนี้สามารถสร้างสปอร์ซึ่งทนต่อความร้อนได้สูง การให้ความร้อนแก่อาหารอาจไม่สามารถฆ่าเชื้อนี้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงพบการปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* เหลืออยู่ในอาหาร (ภาคภูมิ และคณะ, 2559)

ลักษณะของเชื้อ

เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก สามารถเจริญในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ สร้างสปอร์ ลักษณะเซลล์ใหญ่รูปท่อน (Rod) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) เชื้อ *Bacillus cereus* มีทั้งชนิดที่ชอบเจริญในอุณหภูมิต่ำๆ (Psychotropic strain) เจริญที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส และชนิดที่ชอบเจริญในอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic strain) เจริญได้ที่ 15-55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30-40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำอิสระต่ำสุดที่เจริญได้ คือ 0.93 ทนเกลือได้ร้อยละ 7 (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2558)

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ

เมื่อรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อหรือสปอร์ของ *Bacillus cereus* จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษหรือโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Bacillus cereus* นั้น สาเหตุเกิดจากสารพิษที่ *Bacillus cereus* สร้างขึ้น เรียกว่า เอนเทอร์ท็อกซิน โดยสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด คือ เอนเทอร์ท็อกซินที่ทนร้อน (Heat stable enterotoxin) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีลักษณะอาการแบบอาเจียน (Emetic form) และเอนเทอร์ท็อกซินที่ไม่ทนร้อน (Heat labile enterotoxin) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีลักษณะอาการเป็นแบบท้องร่วง (Diarrheal form) (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2558) และมีรายงานว่าหากพบ *Bacillus cereus* ในอาหารเกิน 1.0×10^5 เซลล์ต่อกรัม จะเป็นจำนวนที่มากพอที่จะสร้างสารพิษในปริมาณที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (นิภัชราพร และพัชราภรณ์, 2559)

2.5.3 เชื้อ *Listeria monocytogenes*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Listeria monocytogenes*
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
(ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-examination-of-Listeria-monocytogenes-with-Gram-stain-of-blood-culture_fig1_321860886.)

อนุกรมวิธาน (Patricbrc, 2019)

Kingdom Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Bacillales

Family Listeriaceae

Genus *Listeria*

Species *Listeria monocytogenes*

เชื้อ *Listeria monocytogenes* พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ มูลสัตว์ปีกและสัตว์แทะกับคู้ ใน นํ้านมดิบและอาหารที่มีนํ้านมดิบเป็นส่วนประกอบ เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food borne pathogen) กับผู้บริโภคซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างมาก เนื่องจากความรุนแรงของเชื้อทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) และการแท้ง (Abortion) เชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) และเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญลำดับที่ 3 (ร้อยละ 20-30) ของการป่วยตายเนื่องจากโรคอาหารเป็นพิษในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเคยมีรายงานการระบาดในทวีปยุโรปและทวีปอเมริกาเหนือระหว่างปี 1980-1989 และพบว่าวิธีระบาดของเชื้อนี้สามารถเกิดขึ้นได้หลายทาง เช่น จากแม่สู่ลูก จากสัตว์สู่คน และจากโรงพยาบาล การแพร่ระบาดของโรคเป็นการติดต่อผ่านทางอาหาร และร้อยละ 90 ของผู้ที่ติดเชื้อมักเป็นหญิงมีครรภ์ ทารก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หญิงมีครรภ์ที่ติดเชื้ออาจทำให้แท้งบุตร ทารกตายในครรภ์ คลอดก่อนกำหนด หรือคลอดแล้วตาย อัตราป่วยตายคือร้อยละ 24 และมักไม่ค่อยเกิดโรคในคนปกติที่สุขภาพแข็งแรง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2558)

Listeria ก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารจากการเกษตรอย่างมาก เนื่องจากสามารถดำรงชีพในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลายาวนาน เช่น ในสิ่งโสโครก โรงงาน น้ำ ในอาหาร ในพื้นผิวโรงงาน และเจริญเติบโตได้ในที่อุณหภูมิต่ำ 2-4 องศาเซลเซียส เช่น ในตู้เย็น หรือในสภาวะที่แบคทีเรียอื่นไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ มักพบได้บ่อยในอาหารที่มาจากแหล่งของพืชและสัตว์ รวมทั้งอาหารที่ผ่านการปรุงสุกแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารพร้อมบริโภค (Ready to eat food) ได้แก่ แกงนมพาสเจอร์ไรส์ เนย ไอศกรีม ผักดิบ เนื้อดิบ อาหารทะเล (ศุภชัย และโอภาส, 2550)

ลักษณะของเชื้อ

แบคทีเรียในสกุล *Listeria* มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 0.5-2 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูลได้ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe)

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ

ปริมาณเชื้อที่คาดว่าจะทำให้ป่วย (Infective dose) ประมาณ 5×10^5 เซลล์ ระยะฟักตัวโรค 3-90 วัน แต่ส่วนมากประมาณ 7-21 วัน โดยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดโรคอีก เช่น ระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ความรุนแรง (Virulence) ของแบคทีเรีย ลักษณะอาการที่พบบ่อย คือ อาการไข้ ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน (Gastroenteritis) แบคทีเรียมีลักษณะรุกราน (Invasive) คือ การผ่านเยื่อหุ้มผนังด้านในของลำไส้ (Intestinal lining) เข้าไปในเนื้อเยื่อของลำไส้เล็กหรือเซลล์ที่เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และเพิ่มจำนวนตัวเองได้ในร่างกาย สามารถเพิ่มจำนวนใน

เอกสารนี้เป็นที่เอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สงวนไว้ใช้เฉพาะเพื่อเพิ่มจำนวนตัวเองได้ในร่างกาย สามารถเพิ่มจำนวนในไม่ช้ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระแสโลหิต (Bacteraemia) โดยอาการอาจจะลุกลามไปถึงระบบประสาท คือ สมอง (Encephalitis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ อาการของโรคคีสเทอริโอซิสที่เกิดในหญิงตั้งครรภ์ อาจมีอาการคล้ายเป็นไข้หวัดใหญ่ มีอาการไข้อย่างเฉียบพลัน หนาวสั่น ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และในบางครั้ง อาจมีอาการท้องเสีย หรือปวดท้องร่วมด้วย และถ้าการติดเชื้อลุกลามไปยังระบบประสาท ก็จะมีอาการปวดหัว คอแข็ง มึนงง สูญเสียการทรงตัว ตัวสั่น หรืออาจเกิดอาการชักได้ในผู้ป่วยบางราย และอาจส่งผลให้ทารกคลอดก่อนกำหนด เกิดการแท้ง หรือทำให้ทารกที่คลอดออกมามีสุขภาพไม่สมบูรณ์ได้ (ศุภชัย และโอภาส, 2550) ในปี พ.ศ. 2543-2545 กระทรวงสาธารณสุขจึงมีประกาศ กำหนดว่าอาหารจะต้องไม่พบเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างอย่างน้อย 25 มิลลิกรัม (กิตติศักดิ์ และคณะ, 2558)

2.5.4 เชื้อ *Escherichia coli*

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Escherichia coli*

(ที่มา: <https://www.gettyimages.de/detail/foto/coli-bacteria-are-gram-negative-bacilli-or-rods-that-stock-fotografie/vis301171>)

อนุกรมวิธาน (Faner, 2017)

Kingdom Eubacteria

Phylum Proteobacteria

Class Gammaproteobacteria

Order Enterobacteriales

Family Enterobacteriaceae .

Genus *Escherichia*

Species *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้บ่อยอยู่ในลำไส้คนและสัตว์ โดยเชื้อ *Escherichia coli* ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน แต่ก็มีเชื้อ *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นๆ ของร่างกายได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยส่วนใหญ่พบว่ามี การปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

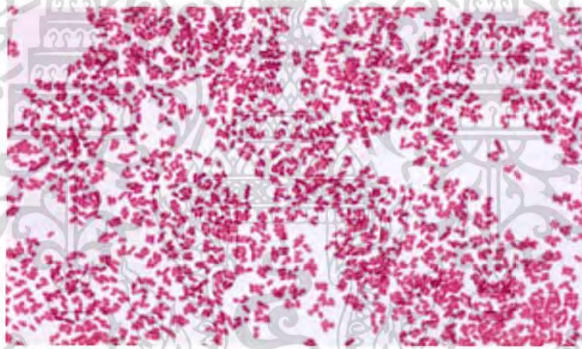
ลักษณะเชื้อ

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform) ประเภทฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำ *Escherichia coli* พบได้ในระบบทางเดินอาหาร เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และเชื้อบางสายพันธุ์ก่อโรคอุจจาระร่วง

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ

อาการเมื่อรับเชื้อนี้เข้าไปจะมีได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงอาการรุนแรง ในบางรายถ่ายเหลวเป็นน้ำ บางรายอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ต่ำร่วมด้วย และอาจรุนแรงถึงขั้นมีอาการปวดบิด ถ่ายเป็นมูกเลือดและมีอาการแทรกซ้อน คือ เกิดกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตก และไตวาย ทั้งนี้อาการรุนแรงต่างๆ ขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายของแต่ละคนที่ได้รับเชื้อ ปัจจัยในการก่อโรคและปริมาณของเชื้อที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย (กิตติศักดิ์ และคณะ, 2558)

2.5.5 เชื้อ *Salmonella* spp.



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Salmonella* spp.

(ที่มา: <http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1267>)

อนุกรมวิธาน (Khanal *et al.*, 2017)

Phylum Proteobacteria

Class Gammaproteobacteria

Order Enterobacteriales

Family Enterobacteriaceae

Genus *Salmonella*

Species *Salmonella enterica*

Subspecies *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Serotype *Salmonella* Typhimurium

ปัจจุบันแบคทีเรียสกุล *Salmonella* มี 2 ชนิด (Species) คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* และโดยทั่วไปเชื้อ *Salmonella* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. *Salmonella* ที่ติดเชื้อเฉพาะในคน ได้แก่ *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi แบบคที่เรียกกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) และไข้พาราไทฟอยด์ (Paratyphoid fever)
2. *Salmonella* ซีโรวาร (Serovar) ที่ปรับตัวอยู่ได้ในสิ่งมีชีวิตเฉพาะบางชนิด (Host-adapted serovars) เช่น *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Abortus-equi และแบบคที่เรีย *Salmonella* บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในคน
3. *Salmonella* ซีโรวารที่ไม่เจาะจงอยู่ในสัตว์ชนิดใด (Unadapted serovars) ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ส่วนใหญ่ปนเปื้อนในอาหาร (สุรีย, 2557)

เชื้อ *Salmonella* ในแต่ละชนิดมีลักษณะความเป็นอยู่หรือการดำรงชีวิตที่ต่างกันไป เช่น เชื้อ *Salmonella* Typhi ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่เรียกว่า ไข้ไทฟอยด์ โดยพบในมนุษย์มากกว่าสัตว์อื่นๆ อย่างไรก็ตามจะพบเชื้อจากสัตว์ติดต่อสู่มนุษย์และสัตว์อื่นๆ เช่น หนู สัตว์ปีก แมลง วัว ควาย สุนัข แมว และม้า เป็นต้น สำหรับการติดเชื้อในมนุษย์นั้นส่วนมากจะได้รับเชื้อปนเปื้อนมาในน้ำ และอาหาร บางครั้งอาจเกิดจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามอาคารบ้านเรือนเป็นพาหะของเชื้อ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อ *Salmonella* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ประกอบกับเชื้อมีอัตราการแพร่ระบาดสูง จึงสามารถพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ในอัตราสูงด้วย และเรียกโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ว่าซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) (กิตติศักดิ์ และคณะ, 2558)

ลักษณะของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดกว้าง 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีรอบเซลล์ ยกเว้น *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Gallinarum และบางสายพันธุ์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ยกเว้น *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Choleraesuis) สร้างกรดและก๊าซจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิที่เจริญได้ดีคือ 37-42 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดี แม้ในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไว้เท่านั้น และสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่ เมื่อนำมาไว้ในอุณหภูมิห้อง แต่เชื้อไม่ทนความร้อน พบว่าถูกทำลายได้ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที (วัลภา, 2549)

2.5.5.1 เชื้อ *Salmonella* Typhimurium

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ

อาการจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนแล้วประมาณ 6-48 ชั่วโมง จะมีอาการอยู่ระหว่าง 1-5 วัน สำหรับอาการของโรคซัลโมเนลโลซิสที่พบได้ทั่วไป คือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดศีรษะ ปวดท้อง มีไข้ หนาวสั่น และอ่อนเพลีย ความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นนั้นจะแตกต่างกันไปตามปริมาณเชื้อที่บริโภค ชนิดของเชื้อที่บริโภค และความต้านทานของผู้บริโภค ถ้าหากเป็นผู้สูงอายุหรือเด็กทารก จะพบว่ามีอาการรุนแรงกว่าคนในวัยอื่นที่บริโภคอาหารปนเปื้อนเชื้อชนิดเดียวกันใน

ปริมาณที่เท่ากัน และยังพบอีกว่าผู้ป่วยโรคเอดส์ (AIDS) มีโอกาสเกิดโรคแทรกซ้อนจากเชื้อ *Salmonella* ได้มากกว่าคนธรรมดาถึง 20 เท่า มาตรฐานที่กำหนดสำหรับการตรวจการปนเปื้อนของไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียในผลิตภัณฑ์นมพร้อมบริโภคชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์ ได้แก่ นมโค นมปรุงแต่ง ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากนมของสัตว์อื่นที่ไม่ใช่ นมของโค ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2543-2545 กำหนดให้ต้องไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม (กิตติศักดิ์ และคณะ, 2558)

2.6 วิธีการประเมินฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง

การวิจัยและพัฒนาทางด้านจุลชีพในปัจจุบันมีวิธีการประเมินฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง (Methods for *In Vitro* evaluating antimicrobial activity) จากแหล่งต่างๆ เพิ่มขึ้น การตรวจสอบคุณภาพของยาต้านจุลชีพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioassay) ได้แก่วิธี Disk diffusion วิธี Well diffusion และ วิธี Broth หรือ Agar dilution ก็ยังเป็นวิธีที่นิยม ส่วนวิธีอื่นๆ ที่ใช้กัน ได้แก่ วิธี Flow cytofluorometric และวิธี Bioluminescent ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดี และข้อเสียแตกต่างกัน (วลัยลักษณ์, 2559)

การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ คือ

1. ลักษณะของงาน เช่น เป็นงานวิจัย งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำ หรือนานๆ ครั้ง และแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ทดสอบน้อย จะนิยมใช้วิธี Agar diffusion test ขณะที่งานที่ต้องการรู้ค่า MBC ของตัวยาจะนิยมใช้วิธี Broth dilution test

2. ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้า หรือเลือกใช้อาหารมาก (Fastidious dilution test) จะนิยมใช้วิธี Broth dilution test ขณะที่เชื้อซึ่งต้องเจริญบนเลือดหรือไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobe) มักใช้วิธี Agar diffusion test หรือเชื้อที่มีอัตราการเจริญไม่คงที่ควรเลือกวิธี Dilution test

3. จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีจำนวนเชื้อทดสอบมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำวิธี Agar dilution test

4. ชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวยาแพร่กระจาย (Diffuse) ในอาหารแข็งไม่ตี จะนิยมหาค่า MIC ด้วยวิธี Dilution test เป็นต้น

5. จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวยาจำนวนมากแต่มีเชื้อจำนวนน้อย จะนิยมใช้ Agar diffusion test

เมื่อเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบได้แล้ว อาจต้องพิจารณปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลต่อการทดสอบ อาทิ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่คืนนั้นควรยอมให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) มากขณะที่มีเชื้อเจริญ ไม่มีสารรบกวนการออกฤทธิ์ของยา มีส่วนผสมที่ปรากฏใน อาหารชนิดเหลวและชนิดแข็งเหมือนกัน (ยกเว้นสารช่วยให้แข็ง) และควรทดสอบก่อนว่าเชื้อชนิดที่ต้องการทดสอบสามารถเจริญได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ ได้แก่ อาหารสูตร Mueller Hinton (MH) ถ้าทดสอบพวกที่เจริญยากจะนิยมใช้สูตร Brain heart infusion หรือสูตร Trypticase soy ในการทดสอบเชื้อรา นั้น อาหารที่ใช้มีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของรา และชนิดของยาที่ทดสอบ กล่าวคือ ถ้าเป็นราชั้นสูงจะใช้สูตร Sabouraud dextrose, Tryptic soy, Potato dextrose agar แต่ถ้าเป็นราชั้นต่ำจะใช้อาหารสูตร Glucose yeast extract เป็นต้น (ประสาทร เอกสและคณะ, 2551) สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 วิธี Disk diffusion

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีซึ่งสามารถปฏิบัติง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (Filter paper disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ จะแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของ ความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่างๆ กันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะที่เดียวกันจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใดๆ (ไกลกระดาษกรอง) ก็จะเจริญ และเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใสหรือโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ขึ้น อัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal inhibitory concentration หรือ MIC)

วิธี Disk diffusion มีข้อดีคือ ง่าย ประหยัด และสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก ซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง (วลัยลักษณ์, 2559)



รูปที่ 2.9 แสดงตัวอย่างการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disk diffusion

(ที่มา: <http://www.bacteriainphotos.com/disk%20diffusion%20testing.html>)

2.6.2 วิธี Dilution susceptibility test

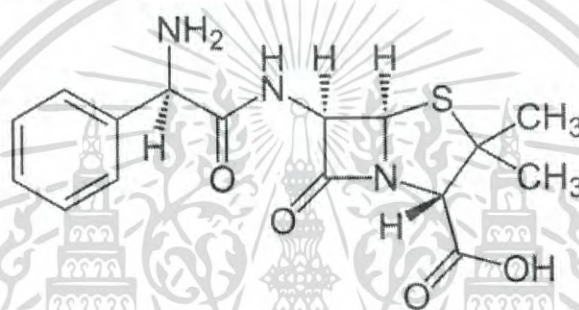
การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า และทดสอบเพื่อยืนยันผลของวิธี Disk diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือด้อยเป็นหลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ Broth และ Agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในหรือบน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดนั้น หลังจากการป่ม จะสามารถตรวจสอบค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารเหลวและมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบนอาหารแข็ง (วลัยลักษณ์, 2559)

2.6.2.1 วิธี Broth dilution test

เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารสกัดที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสารสกัดนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดในความเข้มข้นต่างๆ กัน และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งวิธีการทำ Broth dilution test ยังสามารถแบ่งเป็นการทดสอบระดับหลอดทดลอง (Macrodilution test) และการทดสอบในภาตหลุม (Microtiter plate) (Microdilution dilution test) (วลัยลักษณ์, 2559)

2.7 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน



รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

(ที่มา : <https://cambridgeagents.co.uk/product/ampicillin-antimicrobial-susceptibility-disks>)

แอมพิซิลิน (Ampicillin) เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของเพนิซิลิน เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลคแทม แอมพิซิลินมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่กลุ่ม *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Clostridium* spp., *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, และ *Enterococcus* sp. และสามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Haemophilus influenzae*, *Nisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., และ *Escherichia coli* (Pfizer Labs, 2010) แอมพิซิลินเป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมส และถือเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง (Broad spectrum) ดังนั้นจึงทำให้มีฤทธิ์อ่อนต่อแบคทีเรียที่ผลิตเพนิซิลินเนส ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง ผิวน้ำและการติดเชื้อที่โครงสร้างของผิวน้ำ การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะและหูชั้นกลางอักเสบ (Castle, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายสีเขียวแกมมาที่สกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Synytsya. *et al.* (2015) รายงานว่าสาหร่ายเซลล์พืชพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกจากสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยกลูคูโรโนกาแลคโตแมนแนน (Glucuronogalactomannan) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส และกรดกลูคูโรนิก ร้อยละโดยมวลเท่ากับ 55.4, 25.3 และ 16.3 ตามลำดับ

Choi. *et al.* (2010) วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รายงานว่าสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 44.7 น้ำตาลแรมโนสร้อยละ 0.9 น้ำตาลอะราบินอส (Arabinose) ร้อยละ 1.9 น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) ร้อยละ 2.7 น้ำตาลแมนโนส (Mannose) ร้อยละ 1.4 น้ำตาลฟูโครสร้อยละ 0.4 และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ร้อยละ 31.1

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์สาหร่าย	ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบน้ำตาล
<i>Ankistrodesmus angustus</i>	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส
<i>Porphyridium</i> sp., <i>P. cruentum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>Rhodella reticulata</i>	ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแลคโตส
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส
<i>Gyrodinium impudicum</i>	ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลกาแลคโตส
<i>Aphanothece halophytica</i>	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟูโครส
<i>Arthrospira platensis</i>	ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลฟูโครส
<i>Anabaena</i> sp., <i>Aphanocapsa</i> sp., <i>Cyanothece</i> sp., <i>Gloethece</i> sp., <i>Nostoc</i> sp., <i>Phormidium</i> sp., <i>Synechocystis</i> sp.	ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์	น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลฟูโครส

ที่มา : Raposo. *et al.* (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์สาหร่าย	องค์ประกอบน้ำตาล
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซบูโลส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส
<i>Chlamydomonas Mexicana</i>	น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแล็กโทส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกรดยูโรนิก
<i>Dunaliella salina</i>	น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส
<i>Nostoc</i> sp.	น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส
<i>Oscillaria</i> sp.	น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส
<i>Botryococcus braunii</i>	น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลกาแลคโตส กรดยูโรนิก
<i>Desmococcus olivaceus</i>	น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส

ที่มา : Delattre. et al. (2016)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

การศึกษาของ Raposo. et al. (2015) รายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ เช่น อัลจินเต ฟุกอยแดน (Fucoidan) และลามินาแรน ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล แสดงให้เห็นว่าสามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hennequart (2007) ที่รายงานว่าการสกัดอัลจินเต ฟุกอยแดน และลามิเนต สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และฟุกอยแดนสามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติกที่ดี (สารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้) นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อสุขภาพของมนุษย์

Shusaku. et al. (2001) ศึกษาผลของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล พบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารบางชนิด โดยคาราจีแนนที่ 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งแบคทีเรีย *Salmonella enterica* var. Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio mimicus*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* ชนิดที่สร้างสารพิษภายในเซลล์ (Enterotoxigenic) และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้พบว่าคาราจีแนน และซัลเฟต-เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Sulphated-exopolysaccharide; sEPS) ของสาหร่ายสีแดงขนาดเล็ก *Porphyridium cruentum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อมากที่สุด คือ *Salmonella* Enteritidis (Elchinger et al., 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์หรือการเข้าถึงที่ผิดกฎหมายหากท่านนั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Joon. *et al.* (2018) รายงานว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร *Listeria monocytogenes* KCTC 13064 และ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 3881 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังสามารถยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium KCCM 11862 ได้ที่ MIC เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Belhaj. *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาคุนสมบัติในการต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากไซยาโนแบคทีเรีย *Phormidium versicolor* NCC 466 รายงานว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Phormidium versicolor* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และมีฤทธิ์รุนแรงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* สอดคล้องกับการทดลองของ Quan. *et al.* (2015) รายงานว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc commune* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ดี

Marudhupandi. *et al.* (2014) รายงานว่าฟูคอยแดนจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Turbinaria conoides* มีศักยภาพในการป้องกันการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นการอักเสบแบบเรื้อรังทั้งกระเพาะและลำไส้เล็กส่วนต้น และเป็นต้นเหตุความเสี่ยงของโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยส่งผลกระทบต่อประชากรทั่วโลกร้อยละ 50-80 ซึ่งพบว่าผลของฟูคอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิดนี้สามารถต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* ได้ดี และยังช่วยลดความเสี่ยงของมะเร็งกระเพาะอาหารได้ร้อยละ 24.9-73.5 ในความเข้มข้น 31.25-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น ฟูคอยแดน และลามินาแรน ประสบความสำเร็จอย่างมากในการใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่ให้ยาทางช่องปาก (Oral antibiotics) เพื่อยับยั้งการเติบโตของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* และเพื่อป้องกันการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ในเยื่อบุกระเพาะอาหาร สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ยังใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อปรับปรุงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของปลาที่เลี้ยงในฟาร์มและลดสามารถความไวต่อการติดเชื้อ *Piscirickettsia salmonis* ในปลาได้อีกด้วย (Shannon and Abu-Ghannam, 2016)

Kadam. *et al.* (2015) รายงานว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดแบบอัลตราซาวด์ (Ultrasound assisted extraction) โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Ascophyllum nodosum* และ *Laminaria hyperborea* มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ได้อย่างมีนัยสำคัญ

Abou Zeid. *et al.* (2014) รายงานว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและน้ำเย็นจากสาหร่ายสีแดง *Pterocladia capillacea* และสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyopteris membranacea* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้ดี และในกรณีของการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Pterocladia capillacea* ที่สกัดด้วยน้ำเย็น มีฤทธิ์ในการยับยั้งร้อยละ 56.8 เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vijayabaskar. *et al.* (2012) รายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบซึ่งสกัดจากสาหร่าย *Sargassum swartzii* สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคของมนุษย์ได้ถึง 10 สายพันธุ์ ซึ่งในกรณีของการยับยั้ง *Escherichia coli* สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายชนิดนี้มีศักยภาพในการยับยั้งได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะแอมพิซิลินมาตรฐาน โดยวิเคราะห์จากวิธี Disk diffusion

นอกจากนี้ Gallon. *et al.* (2019) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์หรือเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่แยกได้จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Botryococcus braunii* และ *Chlorella pyrenoidosa* ที่ผ่านการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน แสดงให้เห็นว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เช่น *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน (Methicillin Resistant *S. aureus* : MRSA) ที่มีประสิทธิภาพ โดยขึ้นอยู่กับขนาดยาที่แบคทีเรียต่อต้านได้

Rizzo. *et al.* (2017) รายงานว่าสารพอลิแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งของสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Undaria pinnatifida* (Ochrophyta) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อีกทั้งพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายชนิดนี้ยังต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้หลายสายพันธุ์

Berri. *et al.* (2016) รายงานว่าผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีน้ำตาล และสาหร่ายสีแดงประกอบด้วยซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จำนวนมากที่เรียกว่า อัลแวน พูแคน และคาราจีแนน ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 4-76 ของน้ำหนักแห้ง โดยสารอัลแวนถือเป็นตัวแทนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีกรดซัลเฟต น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไซโลส กรดไฮดูโรนิก และกรดกลูคูโรนิก เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่สามารถพบได้จากสาหร่ายสีเขียว ในลำดับ Ulvales (เช่น *Enteromorpha sp.*) (Lahaye and Robic , 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต ซึ่งรายงานว่ อัลแวน พูแคน และคาราจีแนน ยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น คุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียและภูมิคุ้มกัน (Wijesekara *et al.*, 2011 ; Silva *et al.*, 2012 ; Fedorov *et al.*, 2013)

Chen. *et al.* (2005) รายงานว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella pacifica* และ *Porphyridium cruentum* มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพจากการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion ซึ่งสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา โดยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Chlorella pacifica* มีฤทธิ์รุนแรงต่อเชื้อรา *Rhizopus chinensis* Saito และ *Piricularia oryzae* Cav มากกว่า ส่วนสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Porphyridium cruentum* มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อราใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 สูตรอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-2) และสูตรอาหารเหลว (ภาคผนวก ก-1)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร N-8 สูตรอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-4) และสูตรอาหารเหลว (ภาคผนวก ก-3)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton ; Srlchem : เกรด AR
4. เอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 80 และ 90) ; Liquor : เกรด AR
5. สารละลาย Sevag (ประกอบด้วยสารละลายของคลอโรฟอร์มและบิวทานอล อัตราส่วน 4 ต่อ 1 โดยปริมาตร)
6. คลอโรฟอร์ม ; BDH : เกรด AR
7. บิวทานอล ; Macron fine chemical : เกรด AR
8. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ; Ajax finechem : เกรด AR
9. อะซิโตนไทรล (Acetonitrile: C_2H_3N) ; Cacro erba : เกรด HPLC
10. น้ำกลั่นปราศจากไอออน
11. ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ; Ampicillin (บริษัท ที.แมน ฟาร์มา จำกัด)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้ปลอดเชื้อแบบไบโอฮาซาด ; Clean line : LA-CLEANLINE BS-120 Serial No.073001
2. ตู้ปลอดเชื้อแบบไบโอฮาซาด ; Ftexlab : BV4-08
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ; Olympus : CH30RF200
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ; Nikon : ECLIPSE E200
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-vis spectrophotometer) ; Shimadzu : UV-1280 Serial No. A12065200380
6. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporators) ; Heidolph
7. เครื่องผสมสาร (Vortex) ; Vortex genie 2 : G560E
8. เครื่องวัดแสง (Digital lux meter) ; LX1010BS
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ; Hettich : Rotina 380
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนวน (Heated circulating bath) ; Velp scientifica : GDE
11. เครื่องแช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezers) ; Thermo scientific : TSU500
12. เครื่องเครื่องอบแห้งแบบเยือกแข็ง (Freez-Dry) ; Heto : Lyolap 3000
13. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) ; Memmert : BKE30
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave) ; Hirayama: HVE50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่อผู้ใดเห็นใบใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแบบลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. ตู้อบความร้อนอุณหภูมิตั้งที่ 180 องศาเซลเซียส (Hot air oven) ; Shel-lab : 1350FD
16. ตู้อบความร้อนอุณหภูมิตั้งที่ 45 องศาเซลเซียส ; LTE : Swallow LI/SWL/02/1
17. เครื่องโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบสมรรถนะสูง (High-performance anion-exchange chromatography) ; Hitachi : Chromaster
18. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (PH Meter) ; Meter toledo : Sevencompct
19. ซีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) ชนิด Improved Neubauer ; Boeco
20. เครื่องเขย่า (Orbital shaker) ; Innova: 2000
21. เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง ; Adventure : ARC120
22. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง ; Sartorius : BSA224S
23. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20–200 ไมโครลิตร ; Gilson Pipetmon : T/12500
24. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100–1,000 ไมโครลิตร ; Eppendorf
25. คาลิเปอร์ (Caliper) ; Mitutoyo
26. ถาดหลุม (Microtiter plate) ขนาด 96 หลุม
27. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เตอบไมโครเวฟ ; Toshiba : ER-G23SC(W), ตู้เย็น, โถดูดความชื้น, หัวเข็มฉีดยาและเข็มฉีดยา (loop and needle), ตะเกียงแอลกอฮอล์, จานเพาะเชื้อ (Petri dish), หลอดทดลอง, ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร, กระจกบอขวด, ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask), หลอดหยด (Dropper), ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask), แท่งแก้วรูปตัวแอล (L-Shape Glass Rod), หลอดหมุนเหวี่ยง (Centrifuge Tube)

3.3 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กทั้งหมดที่ใช้ศึกษา

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก	รหัส	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
1	<i>Chlorella</i> sp.	T1-61	บ่อน้ำริมถนนเส้นหลัก คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	27 พ.ย. 61
2	<i>Chlorella</i> sp.	T2-61	บ่อน้ำ คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	27 พ.ย. 61
3	<i>Chlorella</i> sp.	LT -62	สระบัว คณะครุศาสตร์	10 ม.ค. 62
4	<i>Chlorella</i> sp.	BP-62	บ่อน้ำพุ บริเวณอาคารเรียนรวม สมเด็จพระเทพฯ	7 ก.พ. 62
5	<i>Chlorella</i> sp.	SA-62	บ่อน้ำ คณะครุศาสตร์	7 ก.พ. 62
6	<i>Chlamydomonas</i> sp.	JU-62	บ่อน้ำพุข้างหอประชุมจุฬารักษ์ คณะวิทยาศาสตร์	7 ก.พ. 62
7	<i>Scenedesmus</i> sp.	AJ-62	บ่อน้ำ บริเวณแปลงเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร	11 ก.พ. 62
8	<i>Chlorella</i> sp.	C4-62	บ่อน้ำ คณะวิทยาศาสตร์	11 ก.พ. 62

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 คัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ บริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากนั้นใช้เทคนิค Spread plate ทำการ Spread ลงบนอาหารสูตร BG-11 และ N-8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ประมาณ 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) เป็นเวลา 3-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้เทคนิค Cross streak ทำการ Streak ไอโซเลทของสาหร่ายขนาดเล็กลงบนผิวหน้าอาหาร เพื่อแยกโคลนเดี่ยว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ประมาณ 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) เป็นเวลา 3-7 วัน และนำสายพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า และ 1,000 เท่า เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของสาหร่ายทางสัณฐานวิทยาตาม Vuuren. *et al.* (2006) โดยจำแนก ขนาด รูปร่าง เช่น ทรงกลม รูปไข่ ทรงกระบอก เป็นต้น การเรียงตัว รังควัตถุ รูปร่างของคลอโรพลาสต์ ตำแหน่งและจำนวนของคลอโรพลาสต์ที่แตกต่างกันไป เช่น รังควัตถุบางชนิดอยู่ด้านข้าง (Parietal) บางชนิดอยู่ตรงกลาง (Axile) การเคลื่อนที่รวมไปถึงการที่มีหรือไม่มีแฟลกเจลลา จากนั้นนำเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ถ่ายลงในหลอดอาหารเอียง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อลงในหลอดอาหารเอียง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3-7 วัน แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2 การศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

3.4.2.1 เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยนำสาหร่ายที่เก็บรักษาที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สาหร่ายมีการปรับตัว จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเอียงลงในอาหารเหลว โดยสาหร่ายที่เจริญได้ดีในอาหารสูตร N-8 คือ *Chlorella* sp. T1-61 และ *Chlorella* sp. BP-62 ส่วนสาหร่ายที่เจริญได้ดีในอาหารสูตร BG-11 คือ *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62 และ *Chlorella* sp. C4-62 ซึ่งจะใส่อาหารเหลวสูตรดังกล่าว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เชื้อละ 4 ขวด นำไปบ่มแบบเขย่า 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ประมาณ 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.4

3.4.2.2 วัดการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเตรียมอาหารเหลวสูตร BG-11 และ N-8 ปริมาตร 4 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายอาหารใส่ถังน้ำพลาสติกขนาด 6 ลิตร (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการแช่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 1-2 วัน และทำการชะล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นเจาะฝาขวดและต่อเข้ากับสายยางที่ลวกด้วยน้ำร้อนแล้ว) โดยใส่อาหารเหลวและหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.2.1 ลงไป โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 ของปริมาณอาหาร ทำสายพันธุ์ละ 2 ข้าง จากนั้นนำมาต่อเข้ากับอุปกรณ์ให้อากาศ ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ดังรูปที่ 3.1

จากนั้นทำการวัดการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ทุกๆ 2 วัน โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ 3.1 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในถังปริมาณ 6 ลิตร

3.4.3 สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์แบบหยาบ

ทำการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักเพื่อเก็บเซลล์สาหร่ายทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilized) ทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเริ่มต้น แล้วบดให้เป็นผง (รูปที่ 3.2) จากนั้นกำจัดไขมันด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ภายใน และกำจัดรงควัตถุและสิ่งเจือปนโมเลกุลเล็กทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนมาสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน ตามวิธีของ Belhaj. *et al.* (2017) โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อสาหร่ายแห้ง 21.52 มิลลิลิตรต่อกรัม อุณหภูมิในการสกัด 81 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง และทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เพื่อเก็บสารสกัด (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.2 ผงสาหร่ายที่ได้จากการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน

นำสารสกัดไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 โดยใช้เอทานอล 3 ส่วนต่อสารสกัด 1 ส่วนโดยปริมาตร นำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน และนำตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำมากำจัดโปรตีนด้วยสารละลาย Sevag (ซึ่งประกอบด้วยสารละลายของคลอโรฟอร์มและบิวทานอล อัตราส่วน 4 ต่อ 1 โดยปริมาตร) โดยใช้อัตราส่วนของสารละลาย Sevag ต่อสารสกัด 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบนนำมาทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) (รูปที่ 3.4) ทำการชั่งน้ำหนักแห้งของผงพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อคำนวณหาอัตราผลได้ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของผงพอลิแซ็กคาไรด์}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเริ่มต้น}} \times 100$$



รูปที่ 3.4 แสดงผงพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

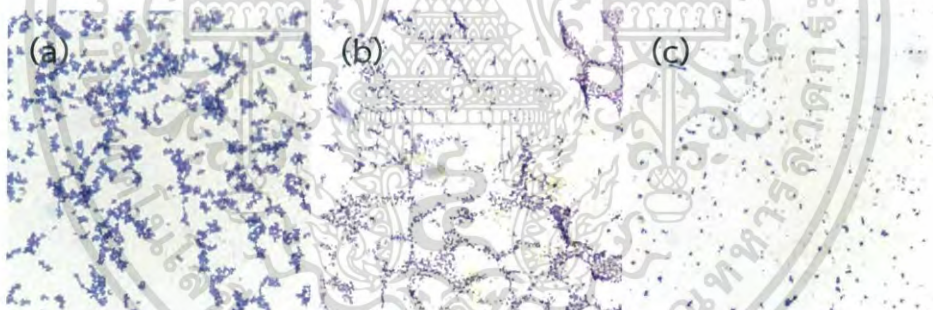
3.4.4 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

3.4.4.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียและอาหารที่ใช้ทดสอบ

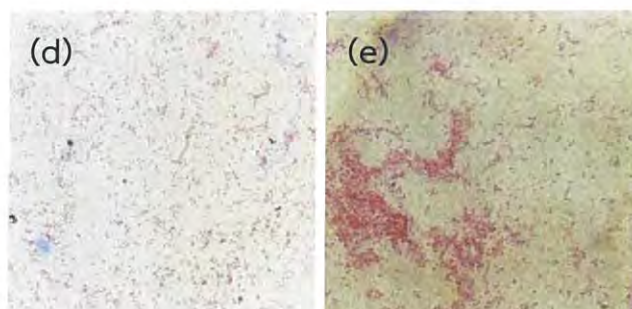
แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 3.2 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ลงบนอาหารสูตร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทำการย้อมแกรม (Gram stain) และถ่ายภาพเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า จากนั้นถ่ายเชื้อใส่หลอดอาหารเลี้ยงสูตร NA นำไปบ่มในสภาวะเดียวกัน สำหรับนำไปใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ

ตารางที่ 3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียแกรมบวก	<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 764 <i>Bacillus cereus</i> TISTR 5040 <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 11256
แบคทีเรียแกรมลบ	<i>Escherichia coli</i> ATCC 1261 <i>Salmonella</i> Typhimurium DMST 0562



รูปที่ 3.5 แสดงแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดแกรมบวก (a) *Staphylococcus aureus* TISTR 764 (b) *Bacillus cereus* TISTR 5040 และ (c) *Listeria monocytogenes* DMST 11256 กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 3.6 แสดงแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดแกรมลบ (d) *Escherichia coli* ATCC 1261 และ (e) *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 กำลังขยาย 1,000 เท่า

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (ภาคผนวก ค-1) ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลน (McFarland Standards) หมายเลข 0.5 (ภาคผนวก ค-2) เทียบกับการปรับระดับความขุ่น (Optical density ; OD) ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.5×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) (Chapin and Lauderdale, 2003)

การเตรียมอาหารสำหรับใช้ทดสอบ

เตรียมอาหารทดสอบ Mueller-Hinton agar (MHA) และอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.3 ± 0.1 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหาร MHA เติลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 25 มิลลิลิตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายตัว แล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

3.4.4.2 ประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Disk diffusion

การประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion (Belhaj *et al.*, 2017) โดยอาศัยหลักการแพร่ของสารสกัดออกมารอบแผ่นกระดาษกรอง (Paper disc) ซึ่งโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้น จะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยทำการ spread เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (จำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ลงบนผิวอาหารแข็ง MHA วางทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ โดยนำผงพอลิแซ็กคาไรด์ของสารย่ำทั้ง 8 สายพันธุ์ มาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยดลงบนแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อแผ่น จะได้ปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น และใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบไปวางลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบ แล้วบ่มนำไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (10 ไมโครกรัมต่อแผ่น) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งด้วยเวอร์เนีย คาลิเปอร์ (Vernier calipers) ทำการวัด 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งการแปลผลการยับยั้งของสารสกัดมาตรฐานสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (CLSI) (ปริญา และอมรรัตน์, 2556) แบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ

1. เชื้อมีความไวต่อสารสกัดสูง (Susceptible: S) คือ ให้โซนการยับยั้งมากกว่า 16 มิลลิเมตร ขึ้นไป
2. เชื้อมีความไวต่อสารสกัดปานกลาง (Intermediate: I) คือ ให้โซนการยับยั้งอยู่ในช่วง 8-16 มิลลิเมตร
3. เชื้อมีความไวต่อสารสกัดต่ำ หรือสามารถต้านฤทธิ์ของสารสกัดได้ (Resistant: R) คือ ให้โซนการยับยั้งน้อยกว่า 8 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นหมายเหตุ: กระดาษกรอง (Paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.3 ประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Broth microdilution

วิธี Broth microdilution เป็นวิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration: MBC)

3.4.4.3.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ (MIC)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ โดยเชื้อเชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิด จากจานเพาะเชื้อมา 1-2 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth (MHB) เชื้อละ 1 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเชื้อให้อยู่ในช่วงกลางของระยะการเจริญแบบทวีคูณ (Mid-log phase) (ภาวนา และคณะ, 2554) จากนั้นปรับความขุ่นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาลแลน (McFarland Standards) หมายเลข 0.5 หรือปรับระดับความขุ่นเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง (Optical density ; OD) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.5×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด 3 อันดับแรก (จากวิธี Disk diffusion) โดยนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางแบบ 0.9 เท่า แล้วนำไปหยดลงในถาดหลุม ขนาด 96 หลุม โดยใส่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้น 1.0 0.9 0.8 0.7 0.6 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในแต่ละหลุมจะใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB 40 ไมโครลิตร เชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.5×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยหลุมที่ใส่เฉพาะอาหาร MHB และแบคทีเรียจะเป็นตัวควบคุมเชิงบวก และหลุมที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (10 ไมโครกรัมต่อหลุม) แทนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จะเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุมเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก แล้วรายงานค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ เป็นค่า MIC (Belhaj *et al.*, 2017)



รูปที่ 3.7 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ค่า MIC ในถาดหลุม ขนาด 96 หลุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.3.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ (MBC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า MBC จะใช้เทคนิค Drop plate (มณฑล, 2560) โดยปิเปตเชื้อแบคทีเรียจากหลุมที่ไม่มีการเจริญเติบโต (จากการหาค่า MIC) 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ปกป้องให้แห้ง แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในแต่ละการทดสอบทำซ้ำ 3 ครั้ง และอ่านผลค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีอาการเจริญของเชื้อ เป็นค่า MBC

การรายงานผลการทดสอบจะอยู่ในรูปอัตราส่วนของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ต่อความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ (MBC/MIC) ซึ่งจะบ่งชี้ถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารสกัด (Belhaj *et al.*, 2017)

- MBC/MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 1 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 : สารสกัดออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal effect)
- MBC/MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 4 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 16 : สารสกัดออกฤทธิ์ชนิดยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Bacteriostatic effect)

3.4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

โดยนำสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก (จากวิธี Disk diffusion) มาวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ตามวิธีการของ Joon. *et al.* (2018) ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมตริก (High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detector: HPAEC-PAD)

ก่อนการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ จำเป็นที่จะต้องทำการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเสียก่อน โดยใช้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 3 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 สายพันธุ์ละ 50 มิลลิกรัม นำมาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นร้อยละ 72 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเข้าเครื่องหม้อนิ่งอัดความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 14 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile: C_2H_3N) อีก 15 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บเฉพาะส่วนใส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองผ่านไซริงก์ฟิลเตอร์ชนิดพอลิเตตระฟลูออโรเอทีลีน (Polytetrafluoroethylene syringe filter) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ 20 ไมโครลิตร ไปฉีดโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 18 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลายที่ใช้ชะ (Eluting solvent) ซึ่งกำหนดอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้น้ำตาลฟูโครส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส และไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีกรดเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลฟรุคโตส เป็นน้ำตาลมาตรฐาน ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแต่ละชนิดในตัวอย่างจะเกิดการแยกภายในคอลัมน์ และแสดงออกมาในรูปของกราฟโครมาโทแกรม (Chromatogram) ซึ่งพีก (Peak) ที่เกิดขึ้นเกิดจากระยะเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (Retention time, RT) และพื้นที่ใต้พีกของแต่ละสารจะทำให้สามารถทราบปริมาณของสารตัวอย่างได้ ซึ่งสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดนั้นๆ (จันทรวรรณ, 2562)

3.4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ เก็บข้อมูลการทดลองละ 3 ซ้ำ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistic version 20 และโปรแกรม Microsoft window excel version 2013



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค Spread plate ลงบนอาหารสูตร BG-11 และ N-8 จากนั้นใช้เทคนิค Cross streak ทำการแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกสาหร่ายขนาดเล็กได้จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยสาหร่ายที่เจริญได้ดีในอาหารสูตร N-8 คือ *Chlorella* sp. T1-61 และ *Chlorella* sp. BP-62 ส่วนสาหร่ายที่เจริญได้ดีในอาหารสูตร BG-11 คือ *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62 และ *Chlorella* sp. C4-62

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า และ 1,000 เท่า พบว่าสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะแสดงดังตารางที่ 4.1 โดยระบุสกุลของสาหร่ายตามรายงานของ Vuuren. *et al.* (2006) พบว่าสาหร่ายสกุล *Chlorella* เป็นเซลล์เดี่ยวขนาดเล็กที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักไม่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมหรือทรงรี คลอโรพลาสต์แบบเดี่ยวรูปถ้วย ไพรีนอยด์บางครั้งมีหรือไม่มีก็ได้ ผนังเซลล์จะบางและเรียบ ส่วนสาหร่ายในสกุล *Chlamydomonas* เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่มีเซลล์เดี่ยวและมีสีเขียว เซลล์อาจเป็นรูปทรงกลม รูปไข่ รูปวงรี หรือรูปลูกแพร์ มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ซึ่งมีความยาวเท่ากัน แฟลกเจลลาถูกแทรกอยู่ใกล้กับส่วนหน้าของเซลล์ แต่ละเซลล์มีคลอโรพลาสต์รูปถ้วย มีไพรีนอยด์ 1 หรือมากกว่า 1 มีอายสปอตสีแดงอยู่บนคลอโรพลาสต์ และมี 2 แวคิวโอลหดตัวอยู่ใกล้ฐานของแฟลกเจลลา ผนังเซลล์นั้นเรียบและประกอบด้วยสารประเภทไกลโคโพรตีนกว่าเซลล์ูโลส และระบุสกุลของสาหร่าย *Scenedesmus* ตามรายงานของ Phinyo. *et al.* (2017) รายงานว่า *Scenedesmus* มีเซลล์รูปวงรี รูปไข่ หรือรูปทรงกระบอก มักอยู่เป็นกลุ่มเซลล์หรือซิงเนียม มีจำนวน 2 4 8 หรือ 32 เซลล์ ผนังเซลล์นั้นเรียบ คลอโรพลาสต์เป็นแถบข้างเซลล์ แต่ละเซลล์มีไพรีนอยด์ 1 อัน เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนามยื่นออกมา

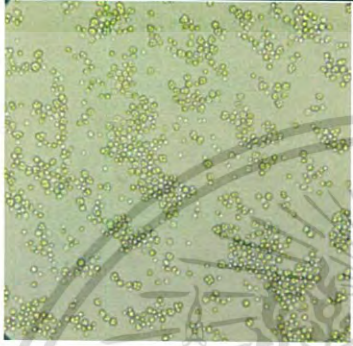
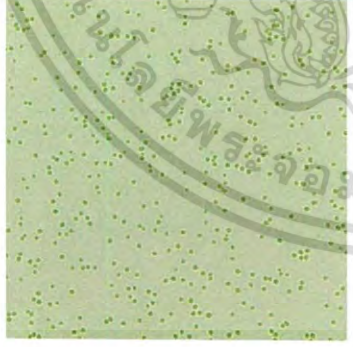
4.2 ผลการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

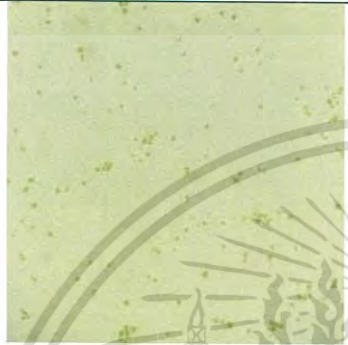
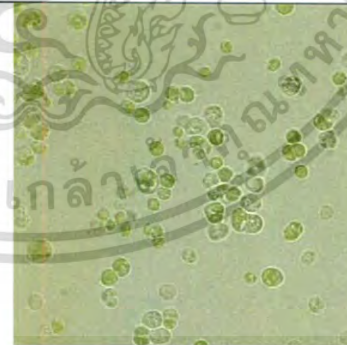
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์ ปริมาตร 4 ลิตร ในถังขนาด 6 ลิตร แล้วทำการวัดการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ทุกๆ 2 วัน โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ การทดลองละ 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ง) และทำการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (ภาคผนวก ข-5) โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่าย	เซลล์สาหร่ายที่กำลังขยาย 400 เท่า	เซลล์สาหร่ายที่กำลังขยาย 1000 เท่า	ลักษณะเซลล์
1	<i>Chlorella</i> sp. T1-61			เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือแถบข้าง เซลล์ มีไฟรีนอยต์ 1 อันอยู่บนคลอโรพลาสต์ ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้
2	<i>Chlorella</i> sp. T2-61			เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือแถบข้าง เซลล์ มีไฟรีนอยต์ 1 อันอยู่บนคลอโรพลาสต์ ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้

3	<i>Chlorella</i> sp. LT-62			เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือแถบข้าง เซลล์ มีพไรรินอยต์ 1 อันอยู่บนคลอโรพลาสต์ ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้
4	<i>Chlorella</i> sp. BP-62			เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือแถบข้าง เซลล์ มีพไรรินอยต์ 1 อันอยู่บนคลอโรพลาสต์ ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้
5	<i>Chlorella</i> sp. SA-62			เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือแถบข้าง เซลล์ มีพไรรินอยต์ 1 อันอยู่บนคลอโรพลาสต์ ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้

6	<i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62			เป็นเซลล์เดี่ยวขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือรี ลักษณะคล้ายกับ <i>Chlorella</i> คลอโรพลาสต์เป็นแถบข้างเซลล์ มีไพรีนอยด์ 1 หรือมากกว่า 1 อัน อยู่บนคลอโรพลาสต์ มีแฟลกเจลลา 2 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีจุดสีแดงหรืออายุสพออยู่ในคลอโรพลาสต์ใกล้กับฐานของแฟลกเจลลา
7	<i>Scenedesmus</i> sp. AJ-62			มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ เรียงต่อกันด้านข้างเซลล์ ซึ่งจะประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2-4 เซลล์ แต่ละเซลล์มีรูปร่างรูปไข่หรือรียาว หัวท้ายมน มีสีเขียว และเซลล์ที่อยู่ริมสุดทั้ง 2 ด้านมีหนาม (Spine) ยื่นออกมา มีคลอโรพลาสต์เป็นแถบข้างเซลล์ ใน 1 เซลล์มีไพรีนอยด์ 1 อัน
8	<i>Chlorella</i> sp. C4-62			เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก สีเขียว รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์เป็นรูปกล้วยหรือแถบข้างเซลล์ มีไพรีนอยด์ 1 อันอยู่บนคลอโรพลาสต์ ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันและเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. JU-62 มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด โดยจะเห็นได้จากอัตราการเจริญจำเพาะต่อวันซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.913 จำนวนเซลล์ 19.850×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดที่ 0.245 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. SA-62 และ *Chlorella* sp. T2-61 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เท่ากับ 2.177 และ 2.079 ตามลำดับ จำนวนเซลล์ 17.476×10^8 และ 6.553×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.123 และ 0.088 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยแสดงกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4.1 ซึ่งผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักของเซลล์แห้ง ทั้ง 3 พารามิเตอร์นี้มีความสัมพันธ์กัน และมีความสัมพันธ์กับการเจริญของสาหร่าย เมื่อค่าการดูดกลืนแสงหรือจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรมีค่าเพิ่มขึ้น น้ำหนักของเซลล์แห้งก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน

ตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. C4-62 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่เร็วที่สุดวันที่ 8 ของการทดลอง ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.656 ตามมาเป็น *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62 และ *Chlorella* sp. T2-61 ซึ่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 10, 12, 14 และ 14 ของการทดลองตามลำดับ โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.654, 2.913, 2.341, 2.508 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของเมเวีย และอัญชนา (2560) รายงานว่า *Chlorella* sp. T10 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 8 ของการทดลอง สาหร่าย *Chlamydomonas* sp. P2 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 12 ของการทดลอง และ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. F15 และ *Scenedesmus* sp. M12 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 14 ของการทดลอง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 และบ่มภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. BP-62 และ *Chlorella* sp. T1-61 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ช้าที่สุดวันที่ 20 ของการทดลองเท่ากัน ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 1.578, 1.601 และ 1.338 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายดังกล่าวอาจจะใช้อาหารในการเจริญได้น้อย หรือสภาวะในการเจริญไม่เหมาะสม หรืออาจเกิดการบดบังแสงสว่างกัน จึงทำให้เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่นานกว่าสายพันธุ์อื่น ทั้งการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายและปัจจัยในการเพาะเลี้ยง การศึกษาของพัฒนศักดิ์ และสุนีย์รัตน์ (2560) กล่าวว่าปัจจัยที่มีผลต่อชีวมวลของสาหร่ายอันดับที่ 1 คือความเข้มของแสง รองลงมาเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แสง และไนโตรเจนจากโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ซึ่งช่วยในการสังเคราะห์รงควัตถุ โดยปัจจัยเหล่านี้จะทำงานเสริมกันในการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่าย นอกจากนี้ โซเดียมและคลอไรด์จะช่วยในการทำงานของเอนไซม์ซึ่งจะช่วยเสริมกับฟอสฟอรัสในการถ่ายทอดพลังงานภายในเซลล์ รวมถึงธาตุเหล็กมีส่วนช่วยให้สาหร่ายสร้างคลอโรฟิลล์ เอ ได้มากขึ้น ทำให้สาหร่ายสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

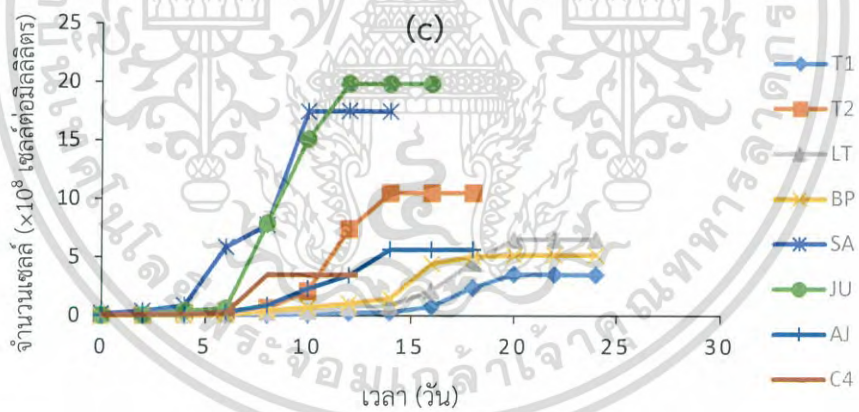
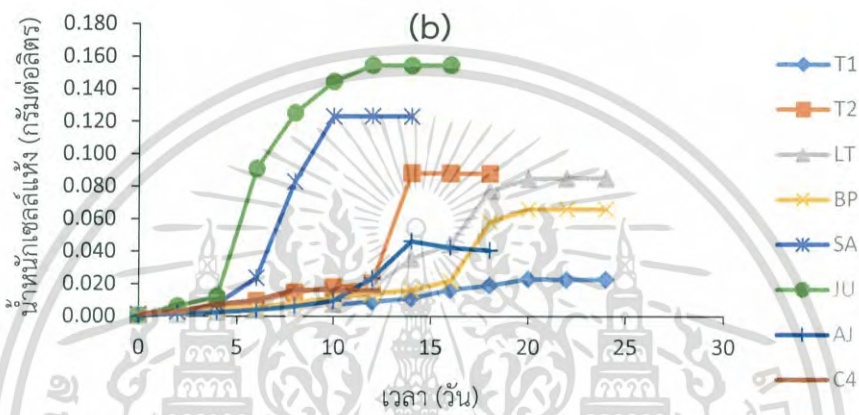
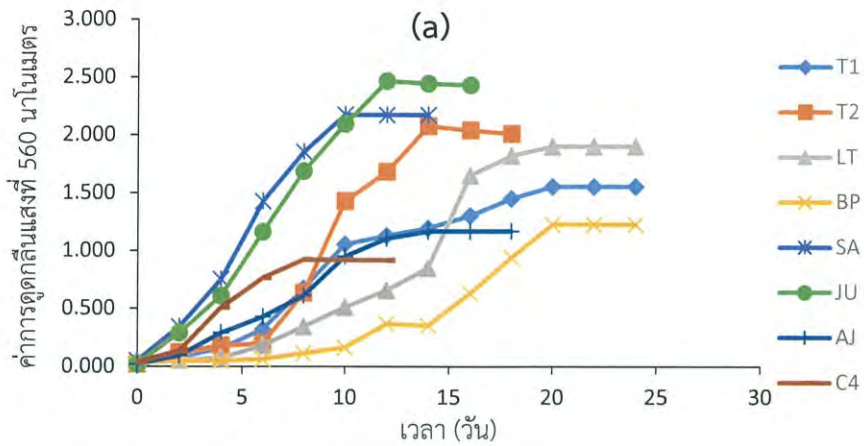
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ เมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

สายพันธุ์สาหร่าย	วันที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะต่อวัน
<i>Chlorella</i> sp. T1-61	20	1.168 \pm 0.00 ^s	3.553 \pm 0.00 ^s	0.023 \pm 0.00 ^s	1.338
<i>Chlorella</i> sp. T2-61	14	2.079 \pm 0.01 ^c	10.493 \pm 0.01 ^c	0.088 \pm 0.00 ^c	2.508
<i>Chlorella</i> sp. LT-62	20	1.900 \pm 0.00 ^d	6.553 \pm 0.01 ^d	0.085 \pm 0.00 ^d	1.578
<i>Chlorella</i> sp. BP-62	20	1.634 \pm 0.00 ^e	5.212 \pm 0.00 ^f	0.066 \pm 0.00 ^e	1.601
<i>Chlorella</i> sp. SA-62	10	2.177 \pm 0.00 ^b	17.476 \pm 0.00 ^b	0.123 \pm 0.00 ^b	2.654
<i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62	12	2.469 \pm 0.01 ^a	19.850 \pm 0.00 ^a	0.245 \pm 0.00 ^a	2.913
<i>Scenedesmus</i> sp. AJ-62	14	1.155 \pm 0.00 ^f	5.660 \pm 0.00 ^e	0.046 \pm 0.00 ^f	2.341
<i>Chlorella</i> sp. C4-62	8	0.926 \pm 0.00 ^h	3.496 \pm 0.00 ^h	0.016 \pm 0.00 ^h	2.656

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, ..., g, h แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ (ด้านแนวตั้ง)



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงเจริญเติบโตของสาหร่าย (a) ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ (b) จำนวนเซลล์ของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ และ (c) น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T1-61, *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. BP-62, *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62, *Chlorella* sp. C4-62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวปริมาตร 4 ลิตร จนเข้าสู่ช่วงระยะการเจริญคงที่ (ตารางที่ 4.2) แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อนำสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์มาสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน จะได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งแสดงผลในรูปของน้ำหนักแห้งและร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yeild) ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และร้อยละผลผลิตที่ได้

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่าย	น้ำหนักเซลล์สาหร่ายแห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)	ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yeild)
1	<i>Chlorella</i> sp. T1-61	1.133±0.00 ^e	1.912±0.02 ^h	0.192±0.00 ^h
2	<i>Chlorella</i> sp. T2-61	1.530±0.01 ^c	3.733±0.04 ^f	0.373±0.00 ^f
3	<i>Chlorella</i> sp. LT-62	1.527±0.0 ^c	21.513±0.07 ^b	2.151±0.00 ^b
4	<i>Chlorella</i> sp. BP-62	1.331±0.01 ^d	3.456±0.01 ^g	0.346±0.00 ^g
5	<i>Chlorella</i> sp. SA-62	1.871±0.01 ^b	19.656±0.10 ^c	1.965±0.01 ^c
6	<i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62	2.237±0.02 ^a	17.509±0.41 ^d	1.756±0.03 ^d
7	<i>Scenedesmus</i> sp. AJ-62	1.318±0.01 ^d	6.922±0.02 ^e	0.693±0.00 ^e
8	<i>Chlorella</i> sp. C4-62	1.032±0.00 ^f	26.297±0.05 ^a	2.627±0.01 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, ..., g, h แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ (ด้านแนวดิ่ง)

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yeild) ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. C4-62 สูงที่สุด อยู่ที่ร้อยละ 2.63 รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. LT-62 (ร้อยละ 2.15), *Chlorella* sp. SA-62 (ร้อยละ 1.96), *Chlamydomonas* sp. JU-62 (ร้อยละ 1.76), *Scenedesmus* sp. AJ-62 (ร้อยละ 0.69), *Chlorella* sp. T2-61 (ร้อยละ 0.37), *Chlorella* sp. BP-62 (ร้อยละ 0.35) และ *Chlorella* sp. T1-61 (ร้อยละ 0.19) ตามลำดับ ซึ่งมีการศึกษารายงานว่าร้อยละ 45 ขององค์ประกอบผนังเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella pyrenoidosa* คือสารประเภทเซลลูโลส และคิดเป็นร้อยละ 33 ของมวลสาหร่ายแห้ง (Northcote *et al.*, 1958) และจากการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้จากผนังเซลล์ของ *Chlorella pyrenoidosa* พบว่าได้อัตราของผลผลิตร้อยละ 2.3 ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) น้ำตาลอะราบินโนส (Arabinose) น้ำตาลไซโลส (Xylose) น้ำตาลแมนโนส (Mannose) น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) และกรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) (White and Barber, 1972) ซึ่งสอดคล้องกับ

รายงานของ Sui. *et al.* (2012) พบว่าที่ผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* ประกอบด้วยสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้เป็นส่วนใหญ่ และจากการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) อีกทั้งหามิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทกราฟี (Gas-liquid chromatography: GLC) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านั้นประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 6 ชนิด คือ น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) และน้ำตาลกลูโคส (Glucose) นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับการสกัด สารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 พบว่า *Scenedesmus* sp. จะผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์สะสมอยู่ภายในเซลล์ (Intracellular polysaccharide: IPS) โดยให้ชีวมวลสูงที่สุดที่ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อนำมาสกัดโดยใช้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเอทานอล พบว่าได้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ สูงที่สุดที่ 5.55 มิลลิกรัมต่อลิตร (He et al., 2014)

ถึงแม้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. JU-62 จะได้ปริมาณสูงที่สุด (2.237 ± 0.02 กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.3) แต่กลับให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ ต่ำกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. (1.032 ± 0.00 กรัมต่อลิตร) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่ของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. เป็นชนิดเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์หรือพอลิแซ็กคาไรด์ที่ ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (Extracellular polysaccharides: EPS) โดยพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะ ถูกปลดปล่อยออกมา และละลายอยู่ในอาหารเหลวขณะทำการเพาะเลี้ยง จึงต้องใช้วิธีอัลตรา-ฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) ในการสกัดออกมา (Bafana, 2013) ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีการสกัด ด้วยน้ำร้อน นอกจากนี้ผนังเซลล์ของ *Chlamydomonas* sp. ประกอบไปด้วยสารประเภทไกลโค-โพรตีนมากกว่าเซลล์ลูโลส จึงทำให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. JU-62 ต่ำกว่า *Chlorella* sp.

จากผลของการสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ทำให้พบว่าผลผลิต ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ไม่สัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของเซลล์ แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย และปัจจัยในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งจากรายงานของ Wongchawalit and Premsuraya (2015) ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำจืดเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าปัจจัยที่มีผล ต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์คือ ความเข้มข้นของแสง และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยง เชื้อ

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

4.4.1 การประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Disk diffusion

จากการนำสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *L. monocytogenes* DMST 11256, *E. coli* ATCC 1261 และ *S. Typhimurium* DMST 0562 ด้วยวิธี Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าเชื้อ *S. aureus* TISTR 764 มีความไวในระดับสูง (Susceptible) ต่อสารสกัดหยาบพอลิ-แซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. LT-62 (16.97 ± 0.64 มิลลิเมตร) รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. T2-61 (12.76 ± 0.24 มิลลิเมตร) และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 (11.51 ± 0.18 มิลลิเมตร) ซึ่งมีความไวปานกลาง ตามลำดับ และ *Chlorella* sp. SA-62 (6.63 ± 0.16 มิลลิเมตร) มีความไวต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มีสงวนลิขสิทธิ์และสงวนชื่อของเอกสารฉบับนี้ ไม่สามารถนำเอกสารฉบับนี้ไปเผยแพร่หรือใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อต่ำที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Ordog (2004) ที่พบว่าสารสกัดจาก *Chlorella minutissima* สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ในชั้นที่ยังอยู่ในช่วง 6.2 ถึง 8.0 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบที่สกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Neisseria mucosa* ได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้โซนยับยั้งสูงที่สุดถึง 22.33 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ *S. aureus* และให้โซนยับยั้งสูงที่สุดที่ 29.67 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ *N. Mucosa* ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Vishwakarma et al., 2019)

เชื้อ *B. cereus* TISTR 5040 มีความไวในระดับปานกลาง (Intermediate) ถึงต่ำ (Resistant) ต่อสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์ โดยมีความไวต่อสารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. AJ-62 สูงที่สุด (11.68±0.68 มิลลิเมตร) รองลงมาเป็น *Chlamydomonas* sp. JU-62 (10.60±0.53 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. C4-62 (10.17±0.60 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. LT-62 (9.42±0.98 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. SA-62 (8.70±0.39 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. T2-61 (7.35±0.34 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. T1-61 (6.97±0.25 มิลลิเมตร) และ *Chlorella* sp. BP-62 (6.38±0.30 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

เชื้อ *L. monocytogenes* DMST 11256 มีความไวต่อสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *Chlorella* sp. T2-61 (6.90±0.17 มิลลิเมตร) และมีความไวในระดับต่ำ (Resistant)

เชื้อ *E. coli* ATCC 1261 มีความไวในระดับต่ำต่อสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. T2-61 (6.85±0.44 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. BP-62 (6.68±0.42 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. LT-62 (6.56±0.71 มิลลิเมตร), *Chlorella* sp. T1-61 (6.43±0.36 มิลลิเมตร) การศึกษาของ Baky. et al. (2013) นำสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่าย *Spirulina platensis* มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* NRRL B-543 และ *Escherichia coli* NRRL B-210 ได้ (ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เชื้อ *S. Typhimurium* DMST 0562 มีความไวในระดับปานกลางต่อสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. LT-62 (12.42±0.95 มิลลิเมตร) และมีความไวในระดับต่ำต่อสารสกัดจาก *Chlorella* sp. SA-62 (6.59±0.09 มิลลิเมตร) และ *Chlorella* sp. C4-62 (6.19±0.09 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

การศึกษาของ Falaise. et al. (2016) ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคต่อมนุษย์และสัตว์น้ำ รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella minutissima*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* และ *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *S. aureus*, *B. subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งพบว่าสารสกัดจาก *Chlorella vulgaris* และ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่สกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้ง *Salmonella Typhi* ได้อีกด้วย นอกจากนี้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กสีแดง *Rhodella reticulate* สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus*, *B. cereus* และ *S. pyogenes* ได้ดีแต่ไม่มีรายงานสำหรับการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในช่องทางอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต หากมีเหตุใด ๆ ที่เกี่ยวข้อง กรุณาแจ้งมาที่ info@science.or.eg หรือ โทร. 02-261-1111

ตารางที่ 4.4ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 8 สายพันธุ์ ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อแผ่น ด้วยวิธี Disk diffusion

สายพันธุ์สาหร่าย	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ	
	<i>S. aureus</i> TISTR 764	<i>B. cereus</i> TISTR 5040	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	<i>E. coli</i> ATCC 1261	<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562
ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	26.83±0.16 ^a	17.87±0.34 ^a	18.72±0.74 ^a	17.87±0.53 ^a	31.98±0.49 ^a
<i>Chlorella</i> sp. T1-61	-	6.97±0.25 ^f	-	6.43±0.36 ^b	-
<i>Chlorella</i> sp. T2-61	12.76±0.24 ^c	7.35±0.34 ^f	6.90±0.17 ^b	6.85±0.44 ^b	-
<i>Chlorella</i> sp. LT-62	16.97±0.64 ^b	9.42±0.98 ^{de}	-	6.56±0.71 ^b	12.42±0.95 ^b
<i>Chlorella</i> sp. BP-62	-	6.38±0.30 ^f	-	6.68±0.42 ^b	-
<i>Chlorella</i> sp. SA-62	6.63±0.16 ^e	8.70±0.39 ^e	-	-	6.59±0.09 ^c
<i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62	11.51±0.18 ^d	10.60±0.53 ^c	-	-	-
<i>Scenedesmus</i> sp. AJ-62	-	11.68±0.68 ^b	-	-	-
<i>Chlorella</i> sp. C4-62	-	10.17±0.60 ^{cd}	-	-	6.19±0.09 ^c

หมายเหตุ: - หมายถึงไม่เกิดโซนยับยั้ง (No inhibition zone)

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, ..., e, f แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 (ด้านแนวตั้ง)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์มีแนวโน้มว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารพอลิแซ็กคาไรด์นั้นมีสาเหตุมาจากตัวรับไกลโคโปรตีน (Glycoprotein-receptors) ที่อยู่บนพื้นผิวของสารพอลิแซ็กคาไรด์จะไปจับกับสารประกอบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียและบริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane) รวมถึงจับกับดีเอ็นเอ (DNA) ของแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลให้มีการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้น และเกิดการรั่วไหลของโปรตีนและดีเอ็นเอ รวมถึงเกิดการหลั่งขององค์ประกอบสำคัญภายในเซลล์ และยังทำลายระบบเอนไซม์ของแบคทีเรีย (Shannon and Abu-Ghannam, 2016 ; Belhaj *et al.*, 2017) แต่เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกที่มีฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบอยู่ ซึ่งสารพอสโฟลิพิดเกิดการรวมตัวระหว่างโมเลกุลของกลีเซอรอลของกรดไขมัน และกรดพอสฟอริก (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2552) รวมถึงมีลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ซึ่งลิโปพอลิแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติเป็นสารพิษชนิดเอนโดท็อกซิน และทำหน้าที่เป็นตัวกั้นเอนไซม์หรือสารเคมีจากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ จึงทำให้ตัวรับไกลโคโปรตีนที่อยู่บนพื้นผิวของสารพอลิแซ็กคาไรด์ไม่สามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมลบได้ (คมสันต์, 2558)

4.4.2 การประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Broth microdilution

จากการคัดเลือกสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารสูงที่สุด 3 ลำดับแรก โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีความไวต่อเชื้อแบคทีเรียในระดับปานกลางถึงสูง และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิดขึ้นไป จากวิธี Disk diffusion ซึ่งได้แก่ *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 ตามลำดับ มาทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ผลการทดสอบพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. LT-62 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ถึง 4 ชนิด โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040 และ *S. Typhimurium* DMST 0562 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และออกฤทธิ์ในการฆ่าทำลายเชื้อ *S. aureus* TISTR 764 ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 5040 และ *S. Typhimurium* DMST 0562 เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* ATCC 1261 ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. T2-61 จัดว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมากเป็นอันดับที่ 2 ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และออกฤทธิ์ในการฆ่าทำลายที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 5040, *L. monocytogenes* DMST 11256, *E. coli* ATCC 1261 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากันที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. JU-62 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* TISTR 764 ซึ่งพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และออกฤทธิ์ในการฆ่าทำลายที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้

ต่อมิลลิลิตร และออกฤทธิ์ในการฆ่าทำลายเชื้อที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *B. cereus* TISTR 5040 มีค่า MIC เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 4.5)

Joon. et al. (2018) รายงานว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Fucus vesiculosus* สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* KCTC 13064 และ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 3881 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดเท่ากับ 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Kjellmaniella crassifolia* และ *Undaria pinnatifida* สามารถยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium KCCM 11862 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Skeletonema costatum* ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ (Terekhova et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris* ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในหนู โดยการช่วยเสริมการผลิตสารไซโตไคน์ (Cytokine) ซึ่งเป็นสารชนิดพอลิเปปไทด์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อการอักเสบและการติดเชื้อ (Hsu et al., 2010)

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ด้วยวิธี Broth microdilution

สายพันธุ์สาหร่าย	สายพันธุ์แบคทีเรีย	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Chlorella</i> sp. LT-62	<i>S. aureus</i> TISTR 764	0.9	1
	<i>B. cereus</i> TISTR 5040	0.9	>1
	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	-	-
	<i>E. coli</i> ATCC 1261	1	>1
	<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562	0.9	>1
<i>Chlorella</i> sp. T2-61	<i>S. aureus</i> TISTR 764	0.8	1
	<i>B. cereus</i> TISTR 5040	1	>1
	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	1	>1
	<i>E. coli</i> ATCC 1261	1	>1
	<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562	-	-
<i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62	<i>S. aureus</i> TISTR 764	0.9	1
	<i>B. cereus</i> TISTR 5040	0.8	>1
	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	-	-
	<i>E. coli</i> ATCC 1261	-	-
	<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้แก่ผู้จัดทำเอกสารเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 หมายเหตุ: หมายถึงไม่เกิดการยับยั้ง (No inhibition) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

จากการคัดเลือกสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารสูงที่สุด 3 ลำดับแรก ซึ่งได้แก่ *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 ตามลำดับ โดยนำสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 สายพันธุ์ มาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 72 แล้วนำไปเข้าเครื่องหมั่นึงอัดความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมตริก (High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detector: HPAEC-PAD) ผลการทดสอบแสดงออกมาในรูปของโครมาโทแกรม (Chromatogram) ซึ่งพีก (Peak) ที่เกิดขึ้นแสดงถึงชนิดและปริมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดนั้นๆ (ภาคผนวก จ)

ผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlorella* sp. LT-62 พบน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบร้อยละ 14.76 และ 9.12 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. JU-62 ไม่พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ตารางที่ 4.6) ซึ่งสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlorella* sp. LT-62 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน ตัวอย่าง เช่น เซลลูโลส (นิธิยา, 2560) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Northcote. *et al.* (1958) พบว่าร้อยละ 45 ขององค์ประกอบผนังเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella pyrenoidosa* คือสารประเภทเซลลูโลส และคิดเป็นร้อยละ 33 ของมวลสาหร่ายแห้ง และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำ จากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 50.54 รองลงมาเป็นน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลฟูโคส ร้อยละ 15.29, 12.03, 11.30, 4.72, 3.8 และ 1.12 ตามลำดับ (Santoyo *et al.*, 2010)

Lagaron. *et al.* (2007) รายงานว่าไคโตซาน (Chitosan: β -(1,4)-2-amino-2-deoxy-d-glucose) ซึ่งเป็นสารประเภทอะมิโนพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อรา โดยมีรายงานว่าสามารถต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ Hernandez. *et al.* (2015) รายงานว่าสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* ประกอบไปด้วยน้ำตาลมอลโทส (Maltose) ร้อยละ 7.7 น้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 70.8 น้ำตาลไซโลส ร้อยละ 13.8 น้ำตาลแรมโนส ร้อยละ 6.5 น้ำตาลฟูโคส (Fucose) ร้อยละ 1.0 และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ร้อยละ 0.2 Choi. *et al.* (2010) รายงานว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 44.7 น้ำตาลแรมโนสร้อยละ 0.9 น้ำตาลอะราบิโนส ร้อยละ 1.9 น้ำตาลกาแลคโตส ร้อยละ 2.7 น้ำตาลแมนโนส ร้อยละ 1.4 น้ำตาลฟูโคส ร้อยละ 0.4 และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ร้อยละ 31.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่าย *Spirulina platensis* ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลว

สมรรถนะสูง พบว่าประกอบไปด้วยกรดกลูคูโรนิก (2.075 -45.15 มิลลิกรัมต่อกรัม) และน้ำตาลกาแลคโตส (0.57 – 2.495 มิลลิกรัมต่อกรัม) เป็นส่วนใหญ่ นอกเหนือจากนั้นเป็นน้ำตาล แรมโนส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไรโบสเพียงเล็กน้อย (Baky *et al.*, 2013)

Delattre. *et al.* (2016) รายงานว่าสาหร่ายแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแตกต่างกัน โดย *Chlamydomonas reinhardtii* ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซบูโลส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส *Chlamydomonas mexicana* ประกอบด้วย น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแล็กโทส น้ำตาลกลูโคส กรดยูโรนิก *Dunaliella salina* ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส *Nostoc sp.* ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส *Oscillaria sp.* ประกอบด้วย น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส *Botryococcus braunii* ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลกาแลคโตส กรดยูโรนิก และ *Desmococcus olivaceus* ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์

องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว	<i>Chlorella</i> sp. LT-62		<i>Chlorella</i> sp. T2-61		<i>Chlamydomonas</i> sp. JU-62	
	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม)	ร้อยละโดย น้ำหนัก (%w/w)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม)	ร้อยละโดย น้ำหนัก (%w/w)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม)	ร้อยละโดย น้ำหนัก (%w/w)
น้ำตาลฟูโคส (Fucose)	-	-	-	-	-	-
น้ำตาลแรมโนส (Ramonose)	-	-	-	-	-	-
น้ำตาลอะราบินอส (Arabinose)	-	-	-	-	-	-
น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose)	-	-	-	-	-	-
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	91.24	9.12	147.62	14.76	-	-
น้ำตาลแมนโนส (Mannose)	-	-	-	-	-	-
น้ำตาลไซโลส (Xylose)	-	-	-	-	-	-
น้ำตาลน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose)	-	-	-	-	-	-
รวมทั้งหมด	91.24	9.12	147.62	14.76	-	-

หมายเหตุ: - หมายถึงไม่พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

5.1.1 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก สามารถคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด อยู่ในสกุล *Chlorella* 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. T1-61, *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. BP-62, *Chlorella* sp. SA-62 และ *Chlorella* sp. C4-62 สกุล *Chlamydomonas* 1 สายพันธุ์ คือ *Chlamydomonas* sp. JU-62 สกุล *Scenedesmus* อีก 1 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. AJ-62

5.1.2 การศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. JU-62 มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด มีอัตราการเจริญจำเพาะต่อวันเท่ากับ 2.913 รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. SA-62 และ *Chlorella* sp. T2-61 ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะต่อวันเท่ากับ 2.654 และ 2.508 ตามลำดับ สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. C4-62 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่เร็วที่สุดวันที่ 8 ของการทดลอง รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. SA-62 และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 ซึ่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 10 และ 12 ของการทดลอง ตามลำดับ

5.1.3 การสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่าร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. C4-62 สูงที่สุด อยู่ที่ร้อยละ 2.63 รองลงมาเป็น *Chlorella* sp. LT-62 ร้อยละ 2.15 และ *Chlorella* sp. SA-62 ร้อยละ 1.96

5.1.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมามากที่สุด 3 ลำดับแรก คือ *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 ซึ่ง *Chlorella* sp. LT-62 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *E. coli* ATCC 1261 และ *S. Typhimurium* DMST 0562 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.9-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. T2-61 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *L. monocytogenes* DMST 11256 และ *E. coli* ATCC 1261 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.8-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 764 และ *B. cereus* TISTR 5040 ได้ที่ MIC เท่ากับ 0.8-0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlorella* sp. LT-62 พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเหมือนกัน ร้อยละ 14.76 และ 9.12 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการคัดแยกสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ ที่หลากหลายมากขึ้น เช่น ไชยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีแดง หรือสาหร่ายทะเลที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร
2. ควรศึกษาเกี่ยวกับสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูงของสาหร่าย
3. ควรทำการศึกษากระบวนการทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ และประเมินความสามารถของสารพอลิแซ็กคาไรด์ในด้านอื่นๆ เช่น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ
4. ควรวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ วงศ์อนุ, ณัฐวุฒิ นามสีฐาน และวิสุทธิ ทำเจริญตระกูล. 2558. การตรวจเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ในนํ้านมดิบจากศูนย์รับนํ้านมในพื้นที่ จังหวัดนครราชสีมา. รายงานโครงการงานเทคโนโลยีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์นม(ต่อเนื่อง) คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน.
- ณรงค์พันธุ์ รัตนปนัดดา. (2557). “ผลของอัลตราโซนิกต่อการสกัดแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดงด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง.” วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต. 7(3) : 45-60.
- ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์. 2552. “ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาศาสตร์อุตสาหกรรมบัณฑิตวิทยาลัย,จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : Noble print.
- นิภัชราพร สถาพร และพิชราภรณ์ น้อยพันธ์. 2559. “การแพร่กระจาย *Bacillus cereus* ในนํ้าพริก อำเภอมือง จังหวัดกำแพงเพชร.” วิจัยและนวัตกรรมกับการพัฒนาประเทศ. 12 : 635-641.
- นารินทร์ จันทร์สว่าง, สุขใจ ชูจันทร์ และ อภารัตน์ มหาพันธ์. 2549. “การศึกษาองค์ประกอบของนํ้าตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสาหร่ายเห็ดคลาบ (*Nostoc commune*, Cyanophyta).” รายงานการวิจัยในโครงการ BRT. 94-104.
- ประสาทพร บริสุทธิเพ็ชร, ทัย กาญจนบุตร และ สาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในท้องปฏิบัติกร.” หน้า 91-101. ใน การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปริญญา มุลสิน และ อมรรัตน์ วงษ์กลม. 2556. “การศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง.” งานวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- พัฒนศักดิ์ ชิวปรีชา และ สุนิรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2560. “สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Desmodemus quadricauda* โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2560. 35(2) : 19-30.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ภาคภูมิ กนกพรเวอร์จัน, รัชชน วารินทร์, จันท์เพ็ญ วิวัฒน์ และ ปิยาภรณ์ สุภักด์ดำรงกุล. 2559. “การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหารโดยเทคนิคพีซีอาร์.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2(1) : 56-70.
- ภาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ เว่นรัมย์ และ ฉันทยาการย์ ศรีวรรมาศ. 2554. “ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดของพืชไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*” วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 23(2) : 151-158.
- มณฑล วิสุทธิ. 2560. “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา.” วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 45(4) : 805-816.
- เมวีญา โต๊ะถึง และ อัญชญา มานะ. 2560. “การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก” โครงการพิเศษวิทยาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วีณา ชูโชติ. 2556. “ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค.” วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 22(2) : 102-114.
- วัลภา ลากภักดี. 2549. “การเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศนิ จิระสถิตย์. 2560. “จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร.” วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 22(2) : 218-232.
- ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ และ โอภาส วงศ์นิติพัฒน์. 2550. ประเมินความเสี่ยงของลิสทีเรียโมโนไซโตจีเนสในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่. [สไลด์]. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหารแห่งชาติ.
- ศิริภรณ์ ชื่นบาล และรฐปน ชื่นบาล. 2553. “การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจจากน้ำเสีย โรงงานฝักและผลไม้กระป๋อง.” รายงานผลการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สมเกียรติ จตุรงค์กล้าเลิศ, วงศ์เทวีญู แสนไชย, ชนวัฒน์ นิตศน์วิจิตร และ จตุรภัทร วาฤทธิ์. 2557. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายเตาโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิคร่วม.” หน้า 388-395. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 40. เชียงใหม่ : คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สุรีย์ นานาสมบัติ. 2557. จุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสาวนิตย์ ชอบบุญ และ พัชรี หล่งหม่าน. 2551. “การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียว ในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา.” รายงานวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

อุทิศ เชื้อบัณฑิต และ สุนนทิพย์ บุณนาค. 2556. “ผลของเบนซีนต่อการเติบโตของสาหร่ายสไปรูลีนา (*Spirulina platensis*).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสำหรับครู บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อภิญา ส่งประดิษฐ์. 2545. “การผลิตวัคซีนและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในปลาตุ๊กตักบูกอย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abou Zeida, A.H. Aboutabl, E.A. Sleem, A.A. and EL-Rafiea, H.M. 2014. “Water soluble Polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities.” Carbohydrate Polymers. 113 : 62-66.

Albertsson, P.A. and Leyon, H. 1954. “The structure of chloroplasts: V. *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim studied by means of electron microscopy.” Experimental Cell Research. 7(1) : 288-290.

Baky, A.L. El Baz KF, H. and EL-Latife, S.A. 2013. “Induction of sulfated polysaccharides in *Spirulina platensis* as response to nitrogen concentration and its biological evaluation.” Journal of Aquaculture Research and Development. 5(1) : 206.

Bafana, A. 2013. “Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*.” Carbohydrate Polymers. 95(2) : 746-52.

Barber, G.A. and White, R.C. 1972. “An acidic polysaccharide from the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*.” Biochimica et Biophysica Acta. 264(1) : 117-128.

Belhaj, D. Frikha, D. Athmounia, K. Jerbib, B. Ahmedc, M.B. Bouallaguid, Z. Kallelb, M. Maaleja, S. Zhouc, J. and Ayadi, H. 2017. “Box-Behnken design for extraction optimization of crude polysaccharides from Tunisian *Phormidium versicolor* cyanobacteria (NCC 466) : Partial characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial activities.” International Journal of Biological Macromolecules. 105 : 1501-1510.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bellinger, E.G. and Sigeo, D.C. 2010. **Fresh water algae**. New York : John Wiley and Sons.

Berri, M. Cindy, S. Olivier, M. Helloin, E. Jacques, I. Salmon, H. Demais, H. Le Goff, M. and Collen, P.N. 2016. "Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cell." *Journal of Applied Phycology*. 28(5) : 1-13.

Castle, S.S. 2007. "Ampicillin." *X pharm the comprehensive pharmacology reference*. 1-6.

Chapin, K.C. and Lauderdale, T.S. 2003. "Reagents, stains, and media: bacteriology." *Manual of Clinical Microbiology*. 8(1) : 354-383.

Chen, X.Q. Zheng, Y. and Lin, X.P. 2005. "Antimicrobial activities of the polysaccharide and protein extracts from two species of microalgae." *Journal of Fujian Normal University (Natural Science)*. 1 : 1-8.

Choi, S.P. Minh, T.N. and Sim, S.J. 2010. "Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production." *Bioresource Technology*. 101 : 5330-5336.

Delattre, C. Pierre, G. Laroche, C. and Michaud, P. 2016. "Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides." *Biotechnology Advances*. 34 : 1159-1179.

Elchinger, P.H. Faugeras, P.A. Boens, B. Brouillette, F. Montplaisir, D. Zerrouki, R. and Lucas, R. 2011. "Polysaccharides: The click chemistry impact." *Polymers*. 3 : 1607-1651.

Falaise, C. Francois, C. Travers, M.A. Morga, B. Haure, J. Tremblay, R. Turcotte, F. Pasetto, P. Gastineau, R. Hardivillier, Y. Leignel, V. and Mouget, J.L. 2016. "Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture." *Marine Drugs*. 14(9) : 1-27.

Faner, R. Sibila, O. Agusti, A. Bernasconi, E. Chalmers, J.D. Huffnagle, G.B. Manichanh, C. Molyneaux, P.L. Paredes, R. Brocal, V.P. Ponomarenko, J. Sethi, S. Dorca, J. and Monso, E. 2017. The microbiome in respiratory medicine: current challenges

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ยังไม่ผ่านการแก้ไขและยังไม่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพเพื่อใช้ในการอ้างอิง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fedorov, S.N. Ermakova, S.P. Zvyagintseva, T.N. and Stonik, V.A. 2013. "Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: some results and prospects." *Marine Drugs*. 11(12) : 4876-4901.
- Flores, L.N. and Barone, R. 2009. "Green algae." *Encyclopedia of Inland Waters*. 1 : 166-173.
- Gallona, S.M.N. Alpaslan, E. Wang, M. Casanova, P.L. Londono, M.E. Atehortua, L. Pavone, J.J. and Webster, T.J. 2019. "Characterization and study of the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal exopolysaccharides." *Materials Science and Engineering*. 99 : 685-695.
- Gardner, L.K. and Lawrence, G.D. 1993. "Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(5) : 693-695.
- Gupta, V. Trivedi, N. Kumar, M. Reddy, C.R.K. and Jha, B. 2013. "Purification and characterization of *exo-β*-agarase from an endophytic marine bacterium and its catalytic potential in bioconversion of red algal cell wall polysaccharides into galactans." *Biomass and Bioenergy*. 49 : 290-298.
- He, Y.Y. Zhou, L. Xu, X.L. Wang, S.Y. Wang, C.H. and Dai, B. 2014. "Uniform design for optimizing biomass and intracellular polysaccharide production from self-flocculating *Scenedesmus* sp. -BH." *Annals of Microbiology*. 4(64) : 1779-1787.
- Hennequart, F. Oconnell, E. Murray, P. Piggott, C and Tuohy, M. 2007. Purification and characterization of a N-acetylglucosaminidase produced by *Talaromyces emersonii* during growth on algae focoidan. *The Journal of Applied Phycology*. 20(5) : 107-115.
- Hernandez, D. Riano, B. Coca, M. and Garcia-Gonzalez, M.C. 2015. "Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pretreatments as a previous step for bioethanol production." *Chemical Engineering Journal*. 262 : 939-945.
- Hsu, H.Y. Jeyashoke, N. Yeh, C.H. Song, Y.J. Hua, K.F. and Chao, L.K. 2009. "Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* Activates macrophages via Toll-Like receptor 4." *Russian Journal of Marine Biology*. 4(35) : 355-358.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Joon, Y.J. Jung, M.J. Jeong, I.H. Yamazaki, k. Kawai, Y. and Kim, B.M. 2018. "Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against dental plaque." *Marine Drugs*. 16(9) : 301.
- Kadam, S.U. O'Donnell, C.P. Rai, D.K. Hossain, M.B. Burgess, C.M. Walsh, D. and Tiwar, B.K. 2015. "Laminarin from Irish brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborean*: Ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity." *Marine Drugs*. 13(7) : 4270-4280.
- Khanal, P.R. Satyal, D. Bhetwal, A. Maharjan, A. Shakya, S. Tandukar, S. and Parajuli, N.P. 2017. "Renaissance of conventional first-line antibiotics in *Salmonella enterica* clinical Isolates: assessment of MICs for therapeutic antimicrobials in enteric fever cases from Nepal." *Biomed Research International*. 1 : 1-6.
- Kraan, S. 2012. "Algal polysaccharides." *Novel applications and outlook*. 489-532.
- Lagaron, J.M. Saiz, F.P. and Ocio, M.J. 2007. "Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide." *Food Chem*. 55(7) : 2554-2562.
- Lahaye, M. and Robic, A. 2007. "Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds." *Biomacromolecules*. 8(6) : 1765-1774.
- Liu, B. Sun, Z. Ma, X. Yang, B. Jiang, Y. Wei, D. and Chen, F. 2015. "Mutation breeding of extracellular polysaccharide-producing microalga *Cryptocodinium cohnii* by a novel mutagenesis with atmospheric and room temperature plasma." *International Journal of Molecular Sciences*. 16(4) : 8201-8212.
- Marudhupandi, T. Thankappan, T. Kumar, A. Lakshmanasenthil, S. Suja, G. Vinothkumar, T. 2015. "In vitro anticancer activity of fucoidan from *Turbinaria conoides* against A549 cell lines." *International Journal of Biological Macromolecules*. 72 : 919-923.
- Northcote, D.H. and Goulding, K.J. 1985. "The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*." *Biochem Journal*. 70(3) : 391-397.
- Ordog, V. Stirk, W.A. Staden, J.V. Novak, O. Strnad, M. 2004. "Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyte." *Phycological Society of America*. 40 : 88- 95.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Parker, B.C. 1964. "The structure and chemical composition of cell walls of three chlorophycean algae." *Phycologia*. 4(2) : 63-74.
- Phinyo, K. Pekkoh, J. Peerapornpisal, Y. 2017. "Distribution and ecological habitat of *Scenedesmus* and related genera in some freshwater resources of Northern and North-Eastern Thailand." *Biodiversitas*. 18 : 1092-1099.
- Quan, Y. Yang, S. Wan, J. Su, T.T. Zhang, J. and Wang, Z.Y. 2015. "Optimization for the extraction of polysaccharides from *Nostoc commune* and its antioxidant and antibacterial activities." *Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 52 : 14-21.
- Raposo Jesus, M.F. Morais, R.M.S.C. and Morais, A.M.M.B. 2013. "Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae." *Marine Drugs*. 11 : 233-252.
- Raposo Jesus, M.F. Morais, R.M.S.C. and Morais, A.M.M.B. 2015. "Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications." *Marine Drugs*. 13(5) : 2967-3028.
- Rastogi, R.P. and Sinha R.P. 2009. "Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites." *Biotechnology Advances*. 27(4) : 521-539.
- Rizzo, C. Genovese, G. Morabito, M. Faggio, C. Pagano, M. Spano, A. Zammuto, V. Minicante, S.A. Manghisi, A. Cigala, R.M. Crea, F. Marino, F. and Gugliandolo, C. 2017. "Potential antibacterial activity of marine macroalgae against pathogens relevant for aquaculture and human health." *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 11(4) : 1695-1706.
- Santoyo, S. Plaza, M. Jaime, L. Ibanez, E. Reglero, G. and Senorans, F.J. 2010. "Pressurized liquid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from the edible microalga *Chlorella vulgaris*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(15) : 8522-8527.
- Shannon, E. and Abu-Ghannam, N. 2016. "Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications." *Marine Drugs*. 14(4) : 1-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shen, G. Qu, D. Li, K. and Li, M. 2017. "Composition of extracellular and intracellular polymeric substances produced by *Scenedesmus* and *Microcystis*." *Environmental Engineering Science*. 34(12) : 887-894.
- Shusaku, Y. Yoshiko, S.K. and Makoto S. 2001. "In vitro bacteriostatic effects of dietary polysaccharides. *Food Science and Technology Research*." 7(3) : 262-264.
- Silva, D.C. Freitas, A.L. Barros, F.C.N. Lins, K.O.A.L. Alves, A.P.N.N. Alencar, N.M.N. Figueiredo, I.S.T. Pessoa, C. Moraes, M.O. Costa-Lotufo, L.V. Feitosa, J.P.A. Maciel, J.S. and Regina, C.M.P. 2012. "Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties." *Carbohydrate Polymers*. 87(1) : 139-145.
- Sui, Z. Gizaw, Y. and BeMiller, J.N. 2012. "Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*." *Carbohydrate Polymers*. 90(1) : 1-7.
- Synytsya, A. Copikova, J. Kim, W.J. and Park, Y.L. 2015. Springer handbooks. Berlin : Heidelberg.
- Terekhova, V.E. Aizdaicher, N.A. Buzoleva, L.S. and Somov, G.P. 2009. "Influence of extrametabolites of marine microalgae on the reproduction of the bacterium *Listeria monocytogenes*." *Russian Journal of Marine Biology*. 35(4) : 355-358.
- Vijayabaskar, P. Vaseela, N. and Thirumaran, G. 2012. "Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*." *Chinese Journal of Natural Medicines*. 10(6) : 421-428.
- Vishwakarma, J. Parmar, V. and Vavilala, S.L. 2019. "Nitrate stress-induced bioactive sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biomedical Research Journal*. 6(1) : 7-16.
- Vuuren, S.J. Taylor, J. Ginkel, C. 2006. **Easy identification of the most common freshwater algae**. Vanderbijlpark : North-West University and Department of Water Affairs and Forestry.
- Wijesekara, I. Pangestuti, R. and Kim, S.K. 2011. "Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae." *Carbohydrate Polymers*. 84(1) : 14-21.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wongchawalit, J. and Prem Suriya, J. 2015. "Screening, isolation and identification of fresh water microalgae and factors influencing of polysaccharide production." *Advances in Environmental Biology*. 9(26) : 29-37.

คมสันต์ วรรณไสย. 2558. พยาธิวิทยาของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อย. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.med.cmu.ac.th/secret/edserv/curriculum/file/.pdf>.

จันทรวรรณ ต้นเจริญ. 2562. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/high-performance-liquid-chromatography-hplc>.

ชลิ ไพบุลย์กิจกุล. 2561. การวัดการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.chanthaburi.buu.ac.th/~chalee/subject/plankton/tpc102_growth_measurement.pdf.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2560. การจำแนกชนิดของคาร์โบไฮเดรต. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/7138>.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2558. *Bacillus*/บาซิลลัส. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus/บาซิลลัส>.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2552. Cell wall / ผนังเซลล์. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4077/cell-wall>.

พรรณพิสุทธิ์ สันติภราดร. 2559. อันตรายจากสารไนเตรต-ไนไตรต์. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/service-knowledge-article-info.php?id=326>.

วลัยลักษณ์ เมธากัทร. 2559. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://bdn.go.th/pt/newsDetail/6>.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2558. *Listeria monocytogenes*. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/5_58.pdf.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2561. อันตราย...อาหารกับสารกันบูด. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://elib.fda.moph.go.th/library/default.asp?page2=subdetail&id_L1=27&id_L2=15799&id_L3=3076.

Baker, A.L. 2017. An image based key to algae (PS Protista), Cyanobacteria and other aquatic objects. [Online]. Available : http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/unicells/flagellated/CHLAMYDOMONAS/Chlamydomonas_Image_page.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bottone, E.J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. [Online]. Available : <https://cmr.asm.org/content/23/2/382/figures-only>.

Cambridge reagents limited. 2018. Ampicillin antimicrobial susceptibility disks. [Online]. Available : <https://cambridgereagents.co.uk/product/ampicillin-antimicrobial-susceptibility-disks>.

Guiry, M.D. 2002. *Chlamydomonas inertis* Korshikov. [Online]. Available : http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=52879.

Guiry, M.D. 2002. *Scenedesmus* (Meyen,1829). [Online]. Available : http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43474&session=abv4:AC1F05EC118271D784In749B67F0.

Hans, N. 2018. Disk diffusion susceptibility test (Kirby-Bauer test). [Online]. Available : <http://www.bacteriainphotos.com/disk%20diffusion%20testing.html>.

Hernandez, U. 2008. Polysaccharides. [Online]. Available : <https://biochemistryquestions.wordpress.com/tag/heteropolysaccharides>.

Maiphae, S. 2017. *Scenedesmus* sp.2. [Online]. Available : <http://www1a.biotech.or.th/TNBI/ViewSpecies.aspx>.

Microbe canvas. 2018. *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium). [Online]. Available : <http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1267>.

Patricbrc. 2019. *Listeria monocytogenes*. [Online]. Available : <https://www.patricbrc.org/view/Taxonomy/1639>.

Patricbrc. 2019. *Listeria*. [Online]. Available : <https://www.patricbrc.org/view/Taxonomy/1637>.

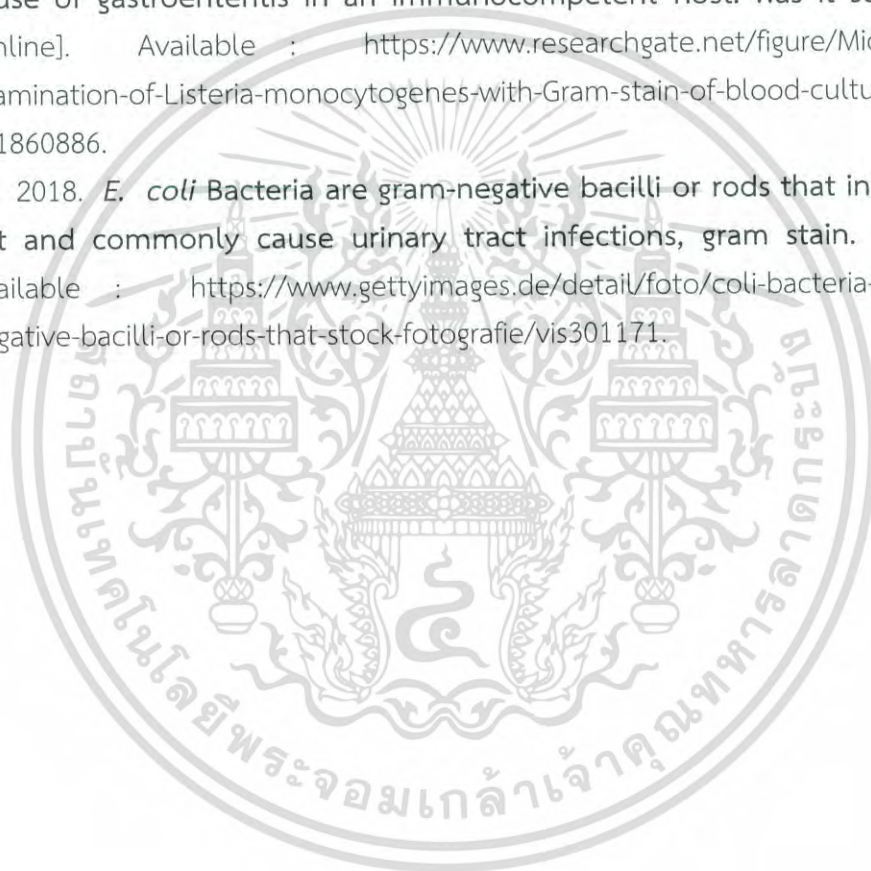
Pfizer labs. 2010. Ampicillin for injection, USP. [Online]. Available : https://www.pfizer.com/files/products/uspi_ampicillin_10g_bulk.pdf.

Rezanka, T. Temina, M. Tolstikov, A.G. Dembitsky, V. 2004. Natural microbial UV radiation filters — Mycosporine-like amino acids. [Online]. Available : https://www.researchgate.net/figure/Freshwater-green-microalga-Scenedesmus-sp-Chlorococcales-Scenedesmaceae-producing_fig4_8190811.

Roberts, K. 2015. Anaerobic digestion of marine microalgae. [Online]. Available : https://www.researchgate.net/figure/Microscope-image-of-Chlorella-sp_fig8_299466154.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อให้บริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Salaba, J. 2013. *Bacillus cereus*-date destroyer. [Online]. Available : http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2013/salaba_jaco/classification.htm.
- Science photo library. 2019. *Staphylococcus aureus* bacteria. [Online]. Available : <https://www.sciencephoto.com/media/12864/view/staphylococcus-aureus-bacteria>.
- Todar, K. 2008. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal disease. [Online]. Available : <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.
- Wahab, A. Chaudhary, S. Ahmad, A. Kollu, V. and Smith, S. 2017. A life-devastating cause of gastroenteritis in an immunocompetent host: was it suspected. [Online]. Available : https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-examination-of-Listeria-monocytogenes-with-Gram-stain-of-blood-culture_fig1_321860886.
- Willis, G. 2018. *E. coli* Bacteria are gram-negative bacilli or rods that inhabit the gut and commonly cause urinary tract infections, gram stain. [Online]. Available : <https://www.gettyimages.de/detail/foto/coli-bacteria-are-gram-negative-bacilli-or-rods-that-stock-fotografie/vis301171>.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ก-1 อาหารสูตร BG-11 สูตรอาหารเหลว

NaNO ₂	1.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.040	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ : 2H ₂ O	0.036	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ammonium ferric citrate	0.006	กรัม
EDTANa ₂ Mg	0.001	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
Trace element mixture*	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
*Trace element mixture		
HBO ₃	2.860	กรัม
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.810	กรัม
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222	กรัม
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.390	กรัม
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ · 5H ₂ O	0.0494	กรัม

ปรับค่าพีเอช เป็น 6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก-2 อาหารสูตร BG-11 สูตรอาหารแข็ง

อาหารเหลว BG-11	1000	มิลลิลิตร
วุ้น (agar)	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-3 อาหารสูตร N-8 สูตรอาหารเหลว

NaHPO ₄ ·2H ₂ O	0.26	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.74	กรัม
CaCl ₂	0.01	กรัม
Fe EDTA	0.01	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	กรัม
KNO ₃	1	กรัม
Trace element mixture	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

*Trace element mixture

Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18 H ₂ O	3.58	กรัม
MnCl ₂ · 4H ₂ O	12.98	กรัม
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.83	กรัม
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอช เป็น 6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก-4 อาหารสูตร N-8 สูตรอาหารแข็ง

อาหารเหลว N-8	1000	มิลลิลิตร
วุ้น (agar)	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

ข-1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) (เมเวีย และอัญชญา, 2560)

1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวทท์ (Cuvett)
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
3. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวอย่าง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย (แกน Y) เพื่อวัดการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

ข-2 การนับจำนวนเซลล์ (cell counting : hemacytometer) (เมเวีย และอัญชญา, 2560)

1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการนับเซลล์ ปริมาตร ตัวอย่างของฮีมาไซโตมิเตอร์ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างของฮีมาไซโตมิเตอร์
2. วางสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้สาหร่ายจมสู่พื้นสไลด์
3. ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำสุดไปกำลังขยายสูงสุด
4. นับเซลล์สาหร่ายบนช่องสี่เหลี่ยมตรงกลาง (25 ช่องใหญ่ ภายในมีตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง)
5. บันทึกจำนวนเซลล์ของตัวอย่างสาหร่าย นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณเซลล์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์ (cell / ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \frac{1}{4} \times 10^6$$

6. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (แกน X) กับจำนวนเซลล์สาหร่าย (แกน Y) เพื่อวัดค่าเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

การใช้งาน Counting Chamber

1. พิจารณาก่อนว่าเราจะเจือจางตัวอย่างหรือไม่ ขึ้นกับความเข้มข้นหรือความหนืดของตัวอย่างที่ต้องการจะนับ 1:10, 1:100 แล้วแต่ความเหมาะสม
2. วางแผ่นกระจกปิดสไลด์ cover slip ลงบน chamber แล้วใช้ปิเปตหรือหลอดหยดหยดตัวอย่างที่ขอบของ cover slip เพียง 1 หยด รอให้ตัวอย่างไหลเข้าไปใต้ slip จนเต็ม แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 หรือ 40 เท่า
3. การนับ WBC ให้นับเซลล์ที่อยู่ใน 4 ช่องใหญ่ด้านนอก ตามหลักการคือนับแบบไป-กลับ

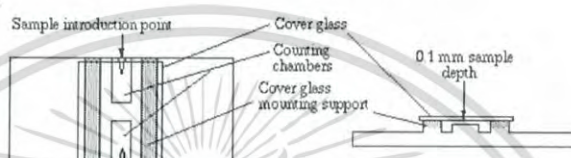
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนเพื่อการค้าหรือเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์เท่านั้น เมื่อผู้จัดทำเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

WBC count = จำนวนเซลล์ที่นับได้ (บริเวณสีเหลือง) \times 2.5 \times อัตราส่วนเจือจาง

- นำจำนวนที่นับได้มาคำนวณกลับเป็นความเข้มข้น ซึ่งมีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร หากมีการเจือจางตัวอย่างให้นำไปคำนวณเพื่อได้ค่าที่แท้จริง เช่น 1:10 ให้เราคูณ 10 เข้าไป
- การนับ RBC ให้นับเซลล์ที่อยู่ใน 5 ช่องเล็ก

RBC count = จำนวนเซลล์ที่นับได้ (บริเวณสีแดง) \times 50 \times อัตราส่วนเจือจาง

- ถ้าเราจางมากๆ ส่องไปดู 5 ช่องเล็กแทบไม่เจอ RBC ก็เปลี่ยนมานับ 4 ช่องใหญ่แบบ WBC แล้วคำนวณเอาได้เลย ส่วนวิธีการนับก็ใช้หลักการเดียวกับ WBC แต่การคำนวณจะต่างไปเล็กน้อยเนื่องจากขนาดพื้นที่ที่นับนั้นไม่เท่ากัน

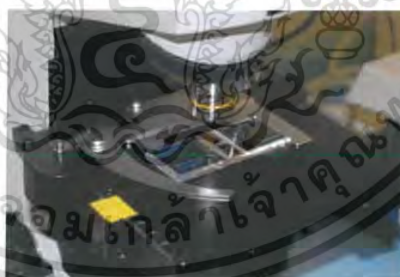


ทิศทางการใส่ตัวอย่าง

รูปที่ ข-1 แสดงลักษณะของฮีมาไซโตมิเตอร์และการหยดตัวอย่าง

(ที่มา: http://www.chanthaburi.buu.ac.th/~chalee/subject/plankton/tpc102_growth_measurement.pdf)

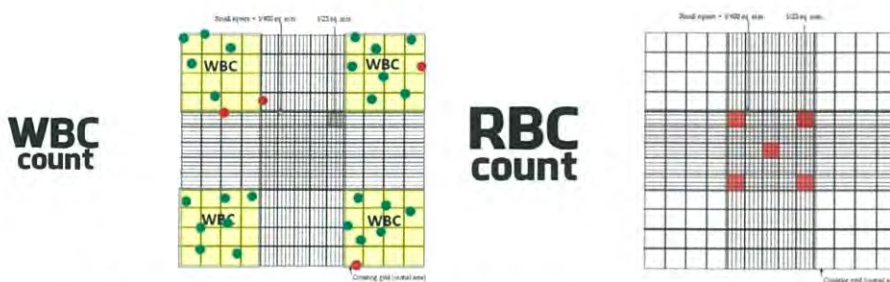
10 X
or
40 X



รูปที่ ข-2 แสดงการส่องกล้องจุลทรรศน์ผ่านฮีมาไซโตมิเตอร์

(ที่มา: http://www.chanthaburi.buu.ac.th/~chalee/subject/plankton/tpc102_growth_measurement.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-3 แสดงการนับ WBC และ RBC บนช่องของฮีมาไซโตมิเตอร์

(ที่มา : http://www.chanthaburi.buu.ac.th/~chalee/subject/plankton/tpc102_growth_measurement.pdf)

ข-4 การหาน้ำหนักแห้ง (Dry weight measurement)

1. ทำการอบหลอดปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ด้วยตู้อบลมร้อน แล้วนำออกจากตู้อบลมร้อนมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งหาน้ำหนักคงที่ของหลอดปั่นเหวี่ยง
2. นำหลอดปั่นเหวี่ยงที่ชั่งแล้วไปใส่น้ำหมักสาหร่ายที่เตรียมไว้ หลอดละ 5 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยง
3. นำหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตัวอย่างสาหร่ายไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เมื่อครบกำหนดเวลา นำหลอดปั่นเหวี่ยงออกจากตู้อบลมร้อน แล้วนำมาใส่ไว้ในโถดูดความชื้น
5. ชั่งน้ำหนักหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตัวอย่างสาหร่าย

การคำนวณ

$$DW \text{ (mg/l)} = \frac{(B-A) \times 1000 \times 1000}{V}$$

- เมื่อ
- A = น้ำหนักของหลอดปั่นเหวี่ยง
 - B = น้ำหนักของหลอดปั่นเหวี่ยงและสาหร่าย
 - V = ปริมาตรของน้ำหมักสาหร่าย (มิลลิลิตร)

ข-5 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) (อุทิส และสุนนทิพย์, 2556)
คำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (Log phase) โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ } (\mu) = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t}$$

- เมื่อ
- μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (วัน⁻¹)
 - N_t คือ ความหนาแน่นของสาหร่ายวันเก็บตัวอย่าง
 - N_0 คือ ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันแรก
 - T คือ เวลา (วัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ให้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลาย

ค-1 การเตรียมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (อภิญา, 2545)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5 กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1000 มิลลิลิตร

ค-2 การเตรียมสาร McFarland Standard หมายเลข 0.5 (อภิญา, 2545)

มาตรฐาน McFarland ถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการปรับความขุ่นของเชื้อ แบคทีเรีย เพื่อให้จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับภายในช่วงที่กำหนด

การเตรียมสาร

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้วไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

2. แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1.175 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ชั่งแบเรียมคลอไรด์ 1.175 กรัม เติมน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วเติมน้ำกลั่น จนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้วไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

การเตรียม McFarland Standard หมายเลข 0.5

1. ใส่กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงในขวดวัดปริมาตร 85 มิลลิลิตร
2. ใช้ปิเปตดูดแบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1.175 มา 0.5 มิลลิลิตร
3. หยดลงไป และทำการเขย่าขวดอย่างต่อเนื่อง
4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
5. นำไปให้ความร้อนและกวนอย่างต่อเนื่อง 3-5 นาที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร เพื่อควบคุมคุณภาพ ค่าที่ยอมรับได้จะต้องอยู่ในช่วง 0.08-0.1
7. เก็บใส่ขวดแก้วฝาเกลียว ปิดด้วยพาราฟิล์ม เก็บได้นาน 3 เดือน

สามารถเตรียม McFarland Standard หมายเลขอื่น ซึ่งมีค่าความขุ่นและจำนวนเซลล์ โดยประมาณมากกว่า 1.5×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ได้โดยดูจากตาราง ค-1 (Chapin and Lauderdale, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-1 แสดงการเทียบความขุ่นกับ McFarland standard

(ที่มา: <https://microbeonline.com/preparation-mcfarland-turbidity-standards/>)

ตาราง ค-1 การเตรียมมาตรฐาน McFarland

McFarland turbidity standard no.	0.5	1	2	3	4
แบเรียมคลอไรด์ (ร้อยละ 1.175) (มิลลิลิตร)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ 1) (มิลลิลิตร)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
จำนวนเซลล์โดยประมาณ (1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	1.5	3	6	9	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการเจริญเติบโต

ตาราง ง แสดงผลระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย 8 สายพันธุ์

ตาราง ง 1-1 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. T1-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.049	0.046	0.047	0.047 \pm 0.00	0.001	0.001	0.001	0.001 \pm 0.00	0.0006	0.0006	0.0007	0.001 \pm 0.00
2	0.081	0.081	0.081	0.081 \pm 0.00	0.005	0.005	0.005	0.005 \pm 0.00	0.0034	0.0032	0.0035	0.003 \pm 0.00
4	0.154	0.165	0.159	0.159 \pm 0.00	0.010	0.011	0.010	0.011 \pm 0.00	0.0041	0.004	0.0043	0.004 \pm 0.00
6	0.286	0.339	0.343	0.323 \pm 0.03	0.079	0.079	0.079	0.079 \pm 0.00	0.0049	0.005	0.0048	0.005 \pm 0.00
8	0.674	0.677	0.675	0.675 \pm 0.00	0.090	0.090	0.090	0.090 \pm 0.00	0.0065	0.0067	0.0069	0.007 \pm 0.00
10	0.850	0.851	0.850	0.850 \pm 0.01	0.174	0.174	0.175	0.174 \pm 0.00	0.0072	0.0072	0.0073	0.007 \pm 0.00
12	0.986	0.986	0.987	0.986 \pm 0.00	0.270	0.270	0.270	0.270 \pm 0.00	0.0090	0.0092	0.0090	0.009 \pm 0.00
14	1.050	1.060	1.065	1.058 \pm 0.00	0.299	0.300	0.299	0.299 \pm 0.00	0.0120	0.0123	0.0096	0.011 \pm 0.00
16	1.126	1.125	1.125	1.125 \pm 0.00	0.805	0.805	0.805	0.805 \pm 0.00	0.0163	0.0165	0.0163	0.016 \pm 0.00
18	1.143	1.143	1.144	1.143 \pm 0.01	2.414	2.416	2.415	2.415 \pm 0.00	0.0193	0.0192	0.0190	0.019 \pm 0.00
20	1.168	1.167	1.168	1.168 \pm 0.00	3.553	3.554	3.552	3.553 \pm 0.00	0.0230	0.0230	0.0233	0.023 \pm 0.00
22	1.167	1.167	1.168	1.167 \pm 0.00	3.543	3.543	3.543	3.543 \pm 0.00	0.0223	0.0222	0.0234	0.023 \pm 0.00
24	1.167	1.167	1.167	1.167 \pm 0.00	3.498	3.498	3.498	3.498 \pm 0.00	0.0232	0.0223	0.0228	0.023 \pm 0.00

ตาราง ง 1-2 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. T2-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.021	0.022	0.023	0.022 \pm 0.00	0.014	0.014	0.014	0.014 \pm 0.00	0.0003	0.0004	0.0003	0.000 \pm 0.00
2	0.120	0.123	0.122	0.122 \pm 0.00	0.036	0.037	0.036	0.036 \pm 0.00	0.0032	0.0038	0.0035	0.004 \pm 0.00
4	0.180	0.183	0.182	0.182 \pm 0.00	0.211	0.235	0.235	0.227 \pm 0.01	0.0056	0.0054	0.0056	0.006 \pm 0.00
6	0.198	0.196	0.204	0.199 \pm 0.00	0.425	0.425	0.425	0.425 \pm 0.00	0.0090	0.0095	0.0100	0.010 \pm 0.00
8	0.633	0.637	0.641	0.637 \pm 0.00	0.652	0.652	0.652	0.652 \pm 0.00	0.0145	0.0155	0.0142	0.015 \pm 0.00
10	1.423	1.430	1.437	1.430 \pm 0.01	2.106	2.106	2.106	2.106 \pm 0.00	0.0177	0.0182	0.0185	0.018 \pm 0.00
12	1.686	1.686	1.685	1.686 \pm 0.00	7.420	7.418	7.417	7.418 \pm 0.00	0.0207	0.0202	0.0200	0.020 \pm 0.00
14	2.074	2.076	2.086	2.079 \pm 0.01	10.500	10.480	10.500	10.493 \pm 0.01	0.0883	0.0883	0.0882	0.088 \pm 0.00
16	2.041	2.041	2.041	2.041 \pm 0.00	10.500	10.480	10.500	10.493 \pm 0.01	0.0880	0.0880	0.0882	0.088 \pm 0.00
18	2.006	2.010	2.016	2.011 \pm 0.00	10.482	10.480	10.482	10.481 \pm 0.00	0.0879	0.0880	0.0878	0.088 \pm 0.00

ตาราง ง 1-3 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. LT-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.043	0.043	0.044	0.043 \pm 0.00	0.038	0.038	0.038	0.038 \pm 0.00	0.0005	0.0007	0.0007	0.001 \pm 0.00
2	0.054	0.057	0.06	0.057 \pm 0.00	0.044	0.044	0.044	0.044 \pm 0.00	0.0011	0.0011	0.0014	0.001 \pm 0.00
4	0.070	0.079	0.074	0.074 \pm 0.00	0.089	0.090	0.089	0.089 \pm 0.00	0.0024	0.0026	0.0026	0.003 \pm 0.00
6	0.180	0.183	0.182	0.182 \pm 0.00	0.145	0.145	0.145	0.145 \pm 0.00	0.0035	0.0037	0.0038	0.004 \pm 0.00
8	0.334	0.356	0.348	0.346 \pm 0.01	0.341	0.341	0.341	0.341 \pm 0.00	0.0048	0.0052	0.0049	0.005 \pm 0.00
10	0.503	0.512	0.525	0.513 \pm 0.01	0.404	0.404	0.404	0.404 \pm 0.00	0.0073	0.0078	0.0073	0.007 \pm 0.00
12	0.658	0.660	0.660	0.659 \pm 0.00	0.780	0.780	0.780	0.780 \pm 0.00	0.0178	0.0176	0.0174	0.018 \pm 0.00
14	0.848	0.849	0.856	0.851 \pm 0.00	0.854	0.854	0.854	0.854 \pm 0.00	0.0353	0.0353	0.0357	0.035 \pm 0.00
16	1.651	1.655	1.652	1.653 \pm 0.00	2.148	2.148	2.148	2.148 \pm 0.00	0.0444	0.0445	0.0445	0.044 \pm 0.00
18	1.823	1.822	1.823	1.823 \pm 0.00	4.535	4.533	4.535	4.534 \pm 0.00	0.0776	0.0774	0.077	0.077 \pm 0.00
20	1.900	1.901	1.900	1.900 \pm 0.00	6.530	6.541	6.530	6.533 \pm 0.01	0.085	0.0849	0.0845	0.085 \pm 0.00
22	1.901	1.900	1.900	1.900 \pm 0.00	6.532	6.532	6.532	6.532 \pm 0.00	0.0851	0.0858	0.0849	0.085 \pm 0.00
24	1.900	1.900	1.900	1.900 \pm 0.00	6.531	6.530	6.533	6.531 \pm 0.00	0.0853	0.0852	0.0851	0.085 \pm 0.00

ตาราง ง 1-4 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. BP-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.035	0.035	0.035	0.035 \pm 0.00	0.012	0.012	0.012	0.012 \pm 0.00	0.0013	0.0012	0.0012	0.001 \pm 0.00
2	0.047	0.046	0.05	0.048 \pm 0.00	0.031	0.031	0.031	0.031 \pm 0.00	0.0032	0.003	0.0035	0.003 \pm 0.00
4	0.052	0.053	0.053	0.053 \pm 0.00	0.067	0.067	0.067	0.067 \pm 0.00	0.0047	0.0045	0.0049	0.005 \pm 0.00
6	0.064	0.069	0.066	0.066 \pm 0.00	0.106	0.106	0.106	0.106 \pm 0.00	0.0054	0.0055	0.0057	0.006 \pm 0.00
8	0.114	0.115	0.115	0.115 \pm 0.00	0.399	0.492	0.495	0.462 \pm 0.04	0.0083	0.0083	0.0080	0.008 \pm 0.00
10	0.167	0.162	0.166	0.165 \pm 0.00	0.726	0.746	0.747	0.740 \pm 0.01	0.0118	0.0114	0.0115	0.012 \pm 0.00
12	0.382	0.37	0.357	0.370 \pm 0.01	1.082	1.082	1.082	1.082 \pm 0.00	0.0139	0.0142	0.0145	0.014 \pm 0.00
14	0.354	0.354	0.354	0.354 \pm 0.00	1.512	1.512	1.512	1.512 \pm 0.00	0.0163	0.0165	0.0163	0.016 \pm 0.00
16	0.632	0.632	0.634	0.633 \pm 0.00	4.508	4.486	4.420	4.471 \pm 0.04	0.0218	0.0216	0.0220	0.022 \pm 0.00
18	1.227	1.227	1.227	1.227 \pm 0.00	5.102	5.102	5.102	5.102 \pm 0.00	0.0580	0.0583	0.0582	0.058 \pm 0.00
20	1.635	1.634	1.632	1.634 \pm 0.00	5.212	5.212	5.212	5.212 \pm 0.00	0.0663	0.0658	0.0662	0.066 \pm 0.00
22	1.630	1.634	1.632	1.632 \pm 0.00	5.219	5.203	5.212	5.211 \pm 0.01	0.0660	0.0664	0.0663	0.066 \pm 0.00
24	1.630	1.632	1.632	1.631 \pm 0.00	5.206	5.216	5.211	5.211 \pm 0.00	0.0662	0.0661	0.0661	0.066 \pm 0.00

ตาราง ง 1-5 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. SA-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.052	0.053	0.053	0.053 \pm 0.00	0.193	0.195	0.193	0.194 \pm 0.00	0.0015	0.0012	0.0015	0.001 \pm 0.00
2	0.334	0.356	0.348	0.346 \pm 0.01	0.423	0.423	0.423	0.423 \pm 0.00	0.0029	0.0027	0.0027	0.003 \pm 0.00
4	0.751	0.758	0.759	0.756 \pm 0.00	0.873	0.871	0.870	0.871 \pm 0.00	0.0076	0.0076	0.0078	0.008 \pm 0.00
6	1.423	1.430	1.437	1.430 \pm 0.01	5.892	5.892	5.892	5.892 \pm 0.00	0.0237	0.0238	0.0238	0.024 \pm 0.00
8	1.854	1.854	1.858	1.855 \pm 0.00	7.772	7.766	7.772	7.770 \pm 0.00	0.0832	0.083	0.083	0.083 \pm 0.00
10	2.178	2.176	2.177	2.177 \pm 0.00	17.476	17.476	17.476	17.476 \pm 0.00	0.123	0.1234	0.1234	0.123 \pm 0.00
12	2.178	2.176	2.176	2.177 \pm 0.00	17.530	17.530	17.530	17.530 \pm 0.00	0.1233	0.1234	0.1235	0.123 \pm 0.00
14	2.176	2.176	2.178	2.177 \pm 0.00	17.468	17.468	17.468	17.468 \pm 0.00	0.1235	0.123	0.1234	0.123 \pm 0.00

ตาราง ง 1-6 แสดงระยะเวลาเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. JU-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.021	0.023	0.024	0.023 \pm 0.00	0.040	0.050	0.060	0.046 \pm 0.01	0.0006	0.0007	0.0008	0.001 \pm 0.00
2	0.293	0.294	0.295	0.294 \pm 0.00	0.087	0.087	0.087	0.087 \pm 0.00	0.0064	0.0063	0.0064	0.006 \pm 0.00
4	0.614	0.614	0.614	0.614 \pm 0.00	0.435	0.445	0.435	0.438 \pm 0.00	0.0125	0.0124	0.0123	0.012 \pm 0.00
6	1.169	1.161	1.170	1.167 \pm 0.00	0.650	0.630	0.625	0.635 \pm 0.01	0.0918	0.0900	0.0917	0.091 \pm 0.00
8	1.693	1.689	1.689	1.690 \pm 0.00	7.856	7.900	8.000	7.919 \pm 0.06	0.1253	0.1255	0.1254	0.125 \pm 0.00
10	2.325	2.300	2.320	2.315 \pm 0.01	15.460	14.460	15.460	15.127 \pm 0.47	0.1450	0.1446	0.1445	0.145 \pm 0.00
12	2.460	2.473	2.474	2.469 \pm 0.01	19.850	19.850	19.850	19.850 \pm 0.00	0.1550	0.1545	0.1546	0.155 \pm 0.00
14	2.444	2.446	2.448	2.446 \pm 0.00	19.840	19.830	19.840	19.837 \pm 0.00	0.1546	0.1546	0.1545	0.155 \pm 0.00
16	2.430	2.450	2.420	2.433 \pm 0.01	19.830	19.830	19.830	19.830 \pm 0.00	0.1549	0.1548	0.1549	0.155 \pm 0.00



ตาราง ง 1-7 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. AJ-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.021	0.023	0.024	0.023 \pm 0.00	0.059	0.059	0.059	0.059 \pm 0.00	0.0002	0.0006	0.0003	0.000 \pm 0.00
2	0.09	0.1	0.102	0.097 \pm 0.01	0.076	0.076	0.076	0.076 \pm 0.00	0.0018	0.0018	0.0017	0.002 \pm 0.00
4	0.293	0.294	0.295	0.294 \pm 0.00	0.104	0.104	0.104	0.104 \pm 0.00	0.0026	0.0023	0.0027	0.003 \pm 0.00
6	0.432	0.433	0.43	0.432 \pm 0.00	0.294	0.294	0.294	0.294 \pm 0.00	0.004	0.0041	0.004	0.004 \pm 0.00
8	0.614	0.614	0.614	0.614 \pm 0.00	0.893	0.893	0.893	0.893 \pm 0.00	0.0064	0.0064	0.0063	0.006 \pm 0.00
10	0.943	0.955	0.957	0.952 \pm 0.01	2.316	2.316	2.316	2.316 \pm 0.00	0.0094	0.0095	0.01	0.010 \pm 0.00
12	1.105	1.109	1.109	1.108 \pm 0.00	3.445	3.445	3.445	3.445 \pm 0.00	0.0236	0.0233	0.0236	0.024 \pm 0.00
14	1.154	1.156	1.155	1.155 \pm 0.00	5.646	5.646	5.646	5.660 \pm 0.00	0.045	0.046	0.048	0.046 \pm 0.00
16	1.154	1.154	1.154	1.154 \pm 0.00	5.646	5.636	5.636	5.640 \pm 0.00	0.042	0.043	0.042	0.042 \pm 0.00
18	1.154	1.153	1.154	1.154 \pm 0.00	5.636	5.636	5.636	5.636 \pm 0.00	0.041	0.041	0.04	0.041 \pm 0.00

ตาราง ง 1-8 แสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. C4-62

เวลา (เวลา)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.038	0.038	0.037	0.038 \pm 0.00	0.051	0.051	0.051	0.051 \pm 0.00	0.0014	0.0017	0.0013	0.001 \pm 0.00
2	0.139	0.14	0.138	0.139 \pm 0.00	0.107	0.108	0.107	0.107 \pm 0.00	0.0029	0.003	0.0028	0.003 \pm 0.00
4	0.511	0.511	0.513	0.512 \pm 0.00	0.115	0.115	0.116	0.115 \pm 0.00	0.0072	0.0078	0.0074	0.007 \pm 0.00
6	0.768	0.767	0.768	0.768 \pm 0.00	0.256	0.255	0.258	0.256 \pm 0.00	0.0096	0.0102	0.0105	0.010 \pm 0.00
8	0.924	0.926	0.927	0.926 \pm 0.00	3.495	3.496	3.498	3.496 \pm 0.00	0.016	0.0166	0.0162	0.016 \pm 0.00
10	0.92	0.921	0.922	0.921 \pm 0.00	3.493	3.500	3.495	3.496 \pm 0.00	0.0163	0.0163	0.0163	0.016 \pm 0.00
12	0.92	0.92	0.92	0.920 \pm 0.00	3.489	3.500	3.498	3.496 \pm 0.00	0.016	0.0164	0.016	0.016 \pm 0.00

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

จ-1 ผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย ผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่ถูกคัดเลือก 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62 และ *Chlamydomonas* sp. JU-62 โดยทำการย่อยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 72 แล้วนำไปเข้าเครื่องหม้อนิ่งอัดความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ก่อนนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทริก (HPAEC-PAD) ผลการทดสอบแสดงออกมาในรูปของโครมาโทแกรม (Chromatogram) ดังรูปที่ จ-1 ซึ่งเมื่อนำค่า Retention time ของพีคที่เกิดขึ้นเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาตรฐาน พบว่าที่ Retention time เท่ากับ 17.037 และ 17.013 จาก *Chlorella* sp. T2-61 และสาหร่าย *Chlorella* sp. LT-62 ตามลำดับ ใกล้เคียงกับค่า Retention time ของน้ำตาลกลูโคส (Retention time 17.070) (รูปที่ จ-2) กล่าวได้ว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. T2-61 และ *Chlorella* sp. LT-62 คือน้ำตาลกลูโคส สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของตัวอย่างได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ จ-3)

ตาราง จ-1 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ และ Retention time ของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ	Retention time (นาที)
0.15	1545708	17.07
0.25	2627099	17.083
0.4	4263984	17.103
0.5	5296953	17.113
1	10617408	17.157

ตาราง จ-2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง

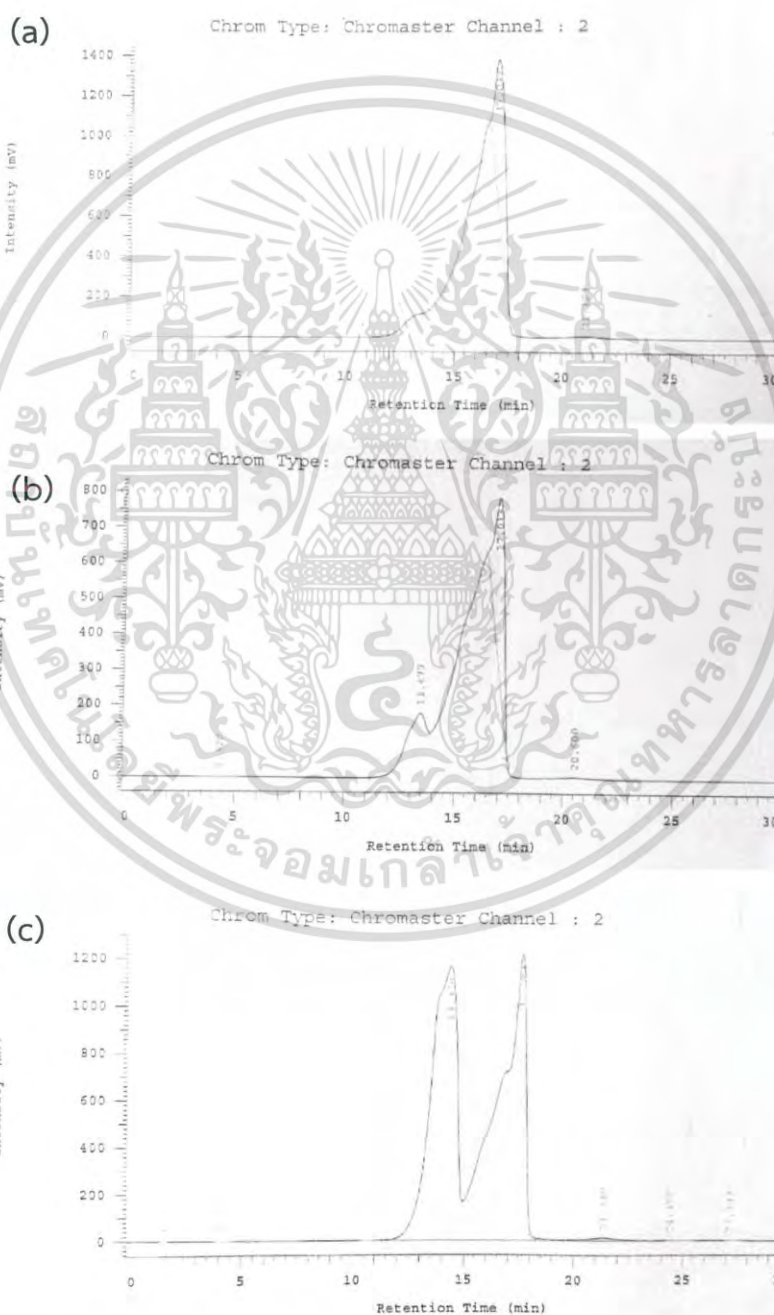
ตัวอย่าง	Retention time (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ			เฉลี่ย
		1	2	3	
JU	-	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	0
LT	17.013	15997959	15193303	14330462	15173908
T2	17.037	25477189	24215843	24020894	24571308.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

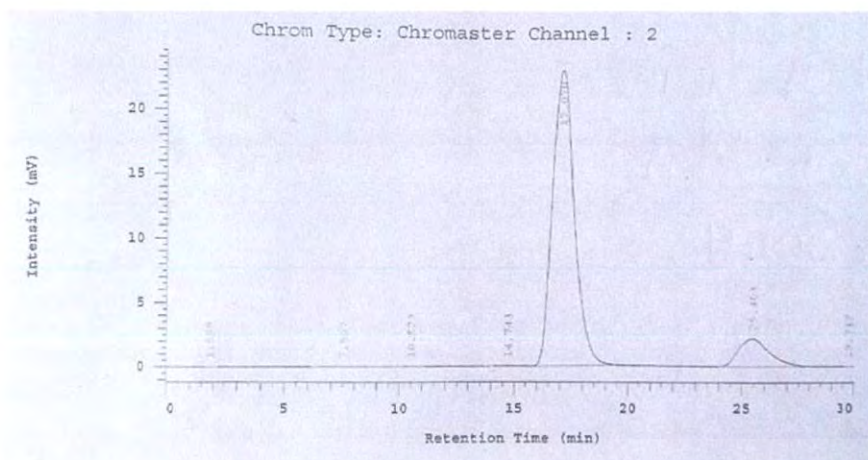
ตาราง จ-3 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	พื้นที่ใต้กราฟ	คิดเป็นความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อัตราการ เจือจาง	ความเข้มข้นแท้จริง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
JU	0	0	3	0
LT	15173908	1.5207445	3	4.5622335
T2	24571308.7	2.460484567	3	7.381453701

หมายเหตุ : น้ำหนักของตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม



รูปที่ จ-1 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์
จากสาหร่าย (a) สาหร่าย *Chlorella* sp. T2-61 (b) สาหร่าย *Chlorella* sp. LT-62
และ (c) สาหร่าย *Chlamydomonas* sp. JU-62



รูปที่ จ-2 โครมาโทแกรมของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ จ-3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ฉ-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์

ผลของอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T1-61, *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. BP-62, *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62 และ *Chlorella* sp. C4-62 ซึ่งทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่

ตาราง ฉ 1-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จำนวนเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ระยะการเจริญคงที่

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
OD ₅₆₀	T1	3	1.16767	.000577	.000333	1.16623	1.16910	1.167	1.168
	T2	3	2.07867	.006429	.003712	2.06270	2.09464	2.074	2.086
	LT	3	1.90033	.000577	.000333	1.89890	1.90177	1.900	1.901
	BP	3	1.63367	.001528	.000882	1.62987	1.63746	1.632	1.635
	SA	3	2.17700	.001000	.000577	2.17452	2.17948	2.176	2.178
	JU	3	2.46900	.007810	.004509	2.44960	2.48840	2.460	2.474
	AJ	3	1.55533	.001155	.000667	1.55246	1.55820	1.554	1.556
	C4	3	.92567	.001528	.000882	.92187	.92946	.924	.927
	Total	24	1.73842	.497687	.101590	1.52826	1.94857	.924	2.474

ตาราง ฉ 1-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จำนวนเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ที่
 ระยะเวลาเจริญคงที่ (ต่อ)

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิเมตร)	T1	3	3.55300	.001000	.000577	3.55052	3.55548	3.552	3.554
	T2	3	10.49333	.011547	.006667	10.46465	10.52202	10.480	10.500
	LT	3	6.53367	.006351	.003667	6.51789	6.54944	6.530	6.541
	BP	3	5.21200	.000000	.000000	5.21200	5.21200	5.212	5.212
	SA	3	17.47600	.000000	.000000	17.47600	17.47600	17.476	17.476
	JU	3	19.85000	.000000	.000000	19.85000	19.85000	19.850	19.850
	AJ	3	5.64600	.000000	.000000	5.64600	5.64600	5.646	5.646
	C4	3	3.49633	.001528	.000882	3.49254	3.50013	3.495	3.498
	Total	24	9.03254	6.080203	1.241116	6.46510	11.59999	3.495	19.850
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	T1	3	.023100	.0001732	.0001000	.022670	.023530	.0230	.0233
	T2	3	.088267	.0000577	.0000333	.088123	.088410	.0882	.0883
	LT	3	.084800	.0002646	.0001528	.084143	.085457	.0845	.0850
	BP	3	.066100	.0002646	.0001528	.065443	.066757	.0658	.0663
	SA	3	.123267	.0002309	.0001333	.122693	.123840	.1230	.1234
	JU	3	.154700	.0002646	.0001528	.154043	.155357	.1545	.1550
	AJ	3	.046333	.0015275	.0008819	.042539	.050128	.0450	.0480
	C4	3	.016267	.0003055	.0001764	.015508	.017026	.0160	.0166
	Total	24	.075354	.0456815	.0093247	.056065	.094644	.0160	.1550

ตาราง ฉ 1-2 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จำนวนเซลล์ และน้ำหนักรีดเซลล์แห้งของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ระยะการเจริญคงที่

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
OD ₅₆₀	Between Groups	5.697	7	.814	59186.637	.000
	Within Groups	.000	16	.000		
	Total	5.697	23			
จำนวนเซลล์	Between Groups	850.284	7	121.469	5490128.129	.000
	Within Groups	.000	16	.000		
	Total	850.284	23			
น้ำหนักรีดเซลล์แห้ง	Between Groups	.048	7	.007	20139.610	.000
	Within Groups	.000	16	.000		
	Total	.048	23			

ตาราง ฉ 1-3 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ของค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จำนวนเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ระยะการเจริญคงที่

OD₅₆₀
Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
C4	3	.92567							
T1	3		1.16767						
AJ	3			1.55533					
BP	3				1.63367				
LT	3					1.90033			
T2	3						2.07867		
SA	3							2.17700	
JU	3								2.46900
Sig.		1.000	1.000	1.000	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.

จำนวนเซลล์

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
C4	3	3.49633							
T1	3		3.55300						
BP	3			5.21200					
AJ	3				5.64600				
LT	3					6.53367			
T2	3						10.49333		
SA	3							17.47600	
JU	3								19.85000
Sig.		1.000	1.000	1.000	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.

น้ำหนักเซลล์แห้ง

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
C4	3	.016267							
T1	3		.023100						
AJ	3			.046333					
BP	3				.066100				
LT	3					.084800			
T2	3						.088267		
SA	3							.123267	
JU	3								.154700
Sig.		1.000	1.000	1.000	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.

ช-2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์

ผลของการสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T1-61, *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. BP-62, *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62 และ *Chlorella* sp. C4-62 ซึ่งเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์สาหร่ายมาสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยทำการชั่งน้ำหนักเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น และน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ จากนั้นคำนวณหาร้อยละของผลผลิตที่ได้

ตาราง ฉ 2-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และร้อยละของผลผลิตที่ได้

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
น้ำหนักเซลล์สาหร่ายแห้ง	T1	3	1.133333	.0033333	.0019245	1.125053	1.141614	1.1300	1.1367
	T2	3	1.530000	.0066667	.0038490	1.513439	1.546561	1.5233	1.5367
	LT	3	1.526667	.0033333	.0019245	1.518386	1.534947	1.5233	1.5300
	BP	3	1.331111	.0050918	.0029397	1.318463	1.343760	1.3267	1.3367
	SA	3	1.871111	.0050918	.0029397	1.858463	1.883760	1.8667	1.8767
	JU	3	2.236667	.0202759	.0117063	2.186299	2.287035	2.2233	2.2600
	AJ	3	1.317778	.0050918	.0029397	1.305129	1.330426	1.3133	1.3233
	C4	3	1.032222	.0019245	.0011111	1.027441	1.037003	1.0300	1.0333
	Total	24	1.497361	.3783233	.0772249	1.337609	1.657113	1.0300	2.2600

ตาราง ฉ 2-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์สำหรับเริ่มต้น น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และร้อยละของผลผลิตที่ได้ (ต่อ)

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์	T1	3	1.9117181	.02378917	.01373468	1.8526225	1.9708136	1.88791	1.93548
	T2	3	3.7328628	.04001702	.02310384	3.6334550	3.8322706	3.68764	3.76368
	LT	3	21.5139284	.07334104	.04234347	21.3317392	21.6961177	21.45969	21.59737
	BP	3	3.4557933	.01320338	.00762298	3.4229942	3.4885923	3.44140	3.46734
	SA	3	19.6557460	.10050647	.05802744	19.4060740	19.9054179	19.57371	19.76786
	JU	3	17.5086013	.41456931	.23935170	16.4787541	18.5384486	17.06490	17.88606
	AJ	3	6.9224687	.01834801	.01059323	6.8768897	6.9680477	6.90176	6.93671
	C4	3	26.2970735	.05104077	.02946840	26.1702812	26.4238658	26.25806	26.35484
	Total	24	12.6247740	9.20622952	1.87921373	8.7373242	16.5122238	1.88791	26.35484
ร้อยละผลผลิต	T1	3	.192000	.0030000	.0017321	.184548	.199452	.1890	.1950
	T2	3	.373333	.0028868	.0016667	.366162	.380504	.3700	.3750
	LT	3	2.151333	.0035119	.0020276	2.142609	2.160057	2.1480	2.1550
	BP	3	.346000	.0000000	.0000000	.346000	.346000	.3460	.3460
	SA	3	1.964667	.0050332	.0029059	1.952163	1.977170	1.9600	1.9700
	JU	3	1.755667	.0270062	.0155920	1.688580	1.822754	1.7290	1.7830
	AJ	3	.693000	.0017321	.0010000	.688697	.697303	.6910	.6940
	C4	3	2.626667	.0080208	.0046308	2.606742	2.646591	2.6190	2.6350
	Total	24	1.262833	.9199729	.1877887	.874363	1.651304	.1890	2.6350

ตาราง ฉ 2-2 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) ของน้ำหนักเซลล์สำหรับเริ่มต้น น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และร้อยละของผลผลิตที่ได้

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเซลล์สำหรับแห้ง	Between Groups	3.291	7	.470	6724.888	.000
	Within Groups	.001	16	.000		
	Total	3.292	23			
น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์	Between Groups	1948.972	7	278.425	11562.986	.000
	Within Groups	.385	16	.024		
	Total	1949.357	23			
ร้อยละของผลผลิต	Between Groups	19.464	7	2.781	26119.338	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	19.466	23			

ตาราง ฉ 2-3 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ของน้ำหนักเซลล์สำหรับเริ่มต้น น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และร้อยละของผลผลิตที่ได้

น้ำหนักเซลล์สำหรับแห้ง (กรัมต่อลิตร)

รหัสสายพันธุ์	N	Duncan ^a					
		Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
C4	3	1.032222					
T1	3		1.133333				
AJ	3			1.317778			
BP	3			1.331111			
LT	3				1.526667		
T2	3				1.530000		
SA	3					1.871111	
JU	3						2.236667
Sig.		1.000	1.000	.069	.632	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

น้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
T1	3	1.9117181							
BP	3		3.4557933						
T2	3			3.7328628					
AJ	3				6.9224687				
JU	3					17.5086013			
SA	3						19.6557460		
LT	3							21.5139284	
C4	3								26.2970735
Sig.		1.000	1.000	1.000	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.

ร้อยละผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
T1	3	.192000							
BP	3		.346000						
T2	3			.373333					
AJ	3				.693000				
JU	3					1.755667			
SA	3						1.964667		
LT	3							2.151333	
C4	3								2.626667
Sig.		1.000	1.000	1.000	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.

ฉ-3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

ผลของการนำสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T1-61, *Chlorella* sp. T2-61, *Chlorella* sp. LT-62, *Chlorella* sp. BP-62, *Chlorella* sp. SA-62, *Chlamydomonas* sp. JU-62, *Scenedesmus* sp. AJ-62 และ *Chlorella* sp. C4-62 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ *S. aureus* TISTR 764, *B. cereus* TISTR 5040, *L. monocytogenes* DMST 11256, *E. coli* ATCC 1261 และ *S. Typhimurium* DMST 0562 ด้วยวิธี Disk diffusion จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง

ตาราง ฉ 3-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
S. aureus TISTR 764	AMP	3	26.8333	.16042	.09262	26.4348	27.2318	26.68	27.00
	T1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	T2	3	12.7600	.24576	.14189	12.1495	13.3705	12.58	13.04
	LT	3	16.9667	.64291	.37118	15.3696	18.5637	16.50	17.70
	BP	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	SA	3	6.6267	.15535	.08969	6.2408	7.0126	6.50	6.80
	JU	3	11.5067	.17926	.10349	11.0614	11.9520	11.30	11.62
	AJ	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	C4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	27	8.2993	9.16201	1.76323	4.6749	11.9236	.00	27.00

ตาราง จ 3-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ (ต่อ)

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
<i>B. cereus</i> TISTR 5040	AMP	3	17.8700	.34395	.19858	17.0156	18.7244	17.56	18.24
	T1	3	6.9667	.25325	.14621	6.3376	7.5958	6.68	7.16
	T2	3	7.3533	.34078	.19675	6.5068	8.1999	7.00	7.68
	LT	3	9.4200	.98000	.56580	6.9855	11.8545	8.44	10.40
	BP	3	6.6800	.41761	.24111	5.6426	7.7174	6.40	7.16
	SA	3	8.7000	.38936	.22480	7.7328	9.6672	8.26	9.00
	JU	3	10.6000	.52915	.30551	9.2855	11.9145	10.00	11.00
	AJ	3	11.6800	.68000	.39260	9.9908	13.3692	11.00	12.36
	C4	3	10.1733	.60178	.34744	8.6784	11.6682	9.60	10.80
	Total	27	9.9381	3.33102	.64106	8.6204	11.2559	6.40	18.24
<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	AMP	3	18.6567	.62740	.36223	17.0981	20.2152	18.26	19.38
	T1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	T2	3	6.9000	.17321	.10000	6.4697	7.3303	6.70	7.00
	LT	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	BP	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	SA	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	JU	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	AJ	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	C4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	27	2.8396	6.10856	1.17559	.4232	5.2561	.00	19.38

ตาราง ฉ 3-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ (ต่อ)

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
E. coli ATCC 1261	AMP	3	17.8667	.53003	.30601	16.5500	19.1833	17.26	18.24
	T1	3	6.6667	.23094	.13333	6.0930	7.2404	6.40	6.80
	T2	3	6.8467	.44467	.25673	5.7420	7.9513	6.58	7.36
	LT	3	6.5600	.71077	.41037	4.7943	8.3257	6.12	7.38
	BP	3	6.3800	.30000	.17321	5.6348	7.1252	6.08	6.68
	SA	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	JU	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	AJ	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	C4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	27	4.9244	5.65118	1.08757	2.6889	7.1600	.00	18.24
S. Typhimurium DMST 0562	AMP	3	31.9800	.49031	.28308	30.7620	33.1980	31.48	32.46
	T1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	T2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	LT	3	12.4200	.95771	.55293	10.0409	14.7991	11.40	13.30
	BP	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	SA	3	6.5867	.09018	.05207	6.3626	6.8107	6.50	6.68
	JU	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	AJ	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	C4	3	6.1933	.09018	.05207	5.9693	6.4174	6.10	6.28
	Total	27	6.3533	10.16906	1.95704	2.3306	10.3761	.00	32.46

หมายเหตุ: AMP หมายถึงยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ตัวควบคุมเชิงบวก)

ตาราง ฉ 3-2 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) ของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>S. aureus</i> TISTR 764	Between Groups	2181.390	8	272.674	4415.901	.000
	Within Groups	1.111	18	.062		
	Total	2182.501	26			
<i>B. cereus</i> TISTR 5040	Between Groups	283.109	8	35.389	118.423	.000
	Within Groups	5.379	18	.299		
	Total	288.488	26			
<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	Between Groups	969.329	8	121.166	2574.149	.000
	Within Groups	.847	18	.047		
	Total	970.176	26			
<i>E. coli</i> ATCC 1261	Between Groups	828.077	8	103.510	826.461	.000
	Within Groups	2.254	18	.125		
	Total	830.331	26			
<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562	Between Groups	2686.304	8	335.788	2574.477	.000
	Within Groups	2.348	18	.130		
	Total	2688.652	26			

ตาราง ฉ 3-3 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ของเส้นผ่านศูนย์กลาง โชนัยบั้งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์

S. aureus TISTR 764
Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
T1	3	.0000					
BP	3	.0000					
AJ	3	.0000					
C4	3	.0000					
SA	3		6.6267				
JU	3			11.5067			
T2	3				12.7600		
LT	3					16.9667	
AMP	3						26.8333
Sig.		1.000	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.

B. cereus TISTR 5040

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
BP	3	6.6800					
T1	3	6.9667					
T2	3	7.3533					
SA	3		8.7000				
LT	3		9.4200	9.4200			
C4	3			10.1733	10.1733		
JU	3				10.6000		
AJ	3					11.6800	
AMP	3						17.8700
Sig.		.170	.124	.109	.352	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

L. monocytogenes DMST 11256

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
T1	3	.0000		
LT	3	.0000		
BP	3	.0000		
SA	3	.0000		
JU	3	.0000		
AJ	3	.0000		
C4	3	.0000		
T2	3		6.9000	
AMP	3			18.6567
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

E. coli ATCC 1261

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SA	3	.0000		
JU	3	.0000		
AJ	3	.0000		
C4	3	.0000		
BP	3		6.3800	
LT	3		6.5600	
T1	3		6.6667	
T2	3		6.8467	
AMP	3			17.8667
Sig.		1.000	.154	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. Typhimurium DMST 0562

Duncan^a

รหัสสายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
T1	3	.0000			
T2	3	.0000			
BP	3	.0000			
JU	3	.0000			
AJ	3	.0000			
C4	3		6.1933		
SA	3		6.5867		
LT	3			12.4200	
AMP	3				31.9800
Sig.		1.000	.199	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.