การคัดแยกและประเมินการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพจากเคปกูสเบอรี่

Screening and determination of potential probiotic bacteria from cape gooseberry

วิภาวี ภู่ทิม
ศรัณยา รุ่งเรืองไพศาล
ศราวุฒิ สารจันทร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening and determination of potential probiotic bacteria from cape gooseberry

Wipawee Pootim

Sarunya Rungruengpaisal

Saravut Sarajun

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกและประเมินการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพจากเคปกูสเบอรี่ Screening and determination of potential probiotic bacteria from cape gooseberry		
เสนอโดย	นางสาว วิภาวี	ภู่ทิม	รหัสนักศึกษา 58050974
	นางสาว ศรัณยา	รุ่งเรืองไพศาล	รหัสนักศึกษา 58050976
	นาย ศราวุฒิ	สารจันทร์	รหัสนักศึกษา 58050977
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกและประเมินการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพจากเคปกูสเบอรี่ Screening and determination of potential probiotic bacteria from cape gooseberry
เสนอโดย	นางสาว วิภาวี ภู่ทิม รหัสนักศึกษา 58050974 นางสาว ศรัณยา รุ่งเรืองไพศาล รหัสนักศึกษา 58050976 นาย ศราวุฒิ สารจันทร์ รหัสนักศึกษา 58050977
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีประโยชน์เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยปรับความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ แล้วยังผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์และประเมินประสิทธิภาพความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากผลเคปกูสเบอรี่ (*Physalis peruviana* L.) พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่ ได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ ENC1 ENC2 และ ENC3 โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกพบว่ามีเพียงแบคทีเรีย ENC3 ที่สามารถทนสภาวะความเป็นกรดด่างที่พีเอช 2 3 4 8 และ 9 ได้ รวมถึงสามารถทนสภาวะเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.15% และ 0.30% ได้ ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย ENC3 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก

คำสำคัญ : เคปกูสเบอรี่ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ แบคทีเรียโพรไบโอติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Screening and determination of potential probiotic bacteria from cape gooseberry		
Students	Miss Wipawee	Pootim	Student ID 58050974
	Miss Sarunya	Rungruengpaisal	Student ID 58050976
	Mr. Saravut	Sarajun	Student ID 58050977
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Dr.Karn Wongsariya		

Abstract

Probiotics are defined as living microorganisms that, when obtained in adequate amounts, provide health benefits (promote healthy balance of gut microorganisms and modulate the functions of gastrointestinal tract). The aims of this research are isolation of endophytic bacteria from cape gooseberry (*Physalis peruvianal*) and evaluation of their potential for probiotic bacteria. Three endophytic bacteria were isolated from cape gooseberry mainly ENC1, ENC2, and ENC3. This group of bacteria was gram positive and could grow under aerobic and anaerobic conditions. According to the result of determination of probiotic property found that only ENC3 could survive in all tested acidic and basic conditions at pH in the range of 2, 3, 4, 8, and 9. Moreover, it was able to resist to bile salt solution at concentrations of 0.15% (w/v) and 0.30% (w/v). According to the results of this experiment, the isolate ENC3 exhibit the outstanding probiotic properties which should be selected as a candidate for further experiment in order to determine it probiotic properties.

Keywords : Cape gooseberry Endophytic bacteria Probiotic bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานพิเศษ ซึ่งเป็นหนึ่งในการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆท่าน ขอขอบพระคุณ ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิด ให้ความช่วยเหลือแนะนำที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำงาน รวมถึงให้กำลังใจและสนับสนุนอุปกรณ์สำหรับการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือ งบประมาณและสถานที่ในการศึกษาทดลอง รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.วราพร เหลือสินทรัพย์ อาจารย์ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาในการคำนวณทางสถิติ และการใช้โปรแกรม SPSS เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอน รวมถึงเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันสำคัญในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน รุ่นพี่ และบุคคลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทดลองในครั้งนี้ที่คอยให้ข้อคิดเห็น ให้กำลังใจ และสนับสนุนกลุ่มของข้าพเจ้าจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วิภาวี ภู่ทิม

ศรัณยา รุ่งเรืองไพศาล

ศราวุฒิ สารจันทร์

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 โพรไบโอติก 3
2.1.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 3
2.1.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก 5
2.2 เคปกูสเบอรี่ 7
2.2.1 ลักษณะของเคปกูสเบอรี่ 7
2.2.2 ประโยชน์ของเคปกูสเบอรี่ 7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 9
3.1 อุปกรณ์ 9
3.2 สารเคมี 10
3.3 เชื้อแบคทีเรีย 11
3.4 ตัวอย่างผลไม้ 11
3.5 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่ 11
3.5.1.1 การคัดเลือกเคปกูสเบอรี่ 11
3.5.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อ 11
3.5.1.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่ 11
3.5.1.4 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ 12
3.5.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย 12
ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ
3.5.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 12
3.5.3.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง 12
3.5.3.2 การติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัว 12
3.5.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 13
3.5.4.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test) 13
3.5.4.2 O-F test (Oxidation-Fermentation test) 13
3.5.5 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก 13
3.5.5.1 การทนกรด 13
3.5.5.2 การทนเกลือน้ำดี 14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 16
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่ 16
และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย 16
ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ
4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 18
4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก 19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25
5.1 สรุปผลการวิจัย 25
5.2 ข้อเสนอแนะ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง 26
ภาคผนวก 34
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 35
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี..... 39
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี 41
และคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น
ภาคผนวก ง ตารางแสดงการคำนวณและวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS 51
ของผลกระทบจากการทดสอบความทนกรดในกระเพาะอาหาร
และความทนเกลือน้ำดีต่อการเจริญของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก เคปกูสเบอรี่บนอาหารแข็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ MRS BHI และ TSA ในสภาวะที่มีอากาศและไร้มีอากาศ	17
2	แสดงผล O-F (Oxidation-Fermentation test) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่	19
3	แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติความสามารถเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่ โดยการทดสอบความสามารถในการทนกรดด่างและทนเกลือน้ำดี	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงผลการทดสอบความทนกรดด่าง (ก.) และความทนเกลือน้ำดี (ข.) ของแบคทีเรีย ENC1 ในสภาวะไร้อากาศ	22
2	แสดงผลการทดสอบความทนกรดด่าง (ก.) และความทนเกลือน้ำดี (ข.) ของแบคทีเรีย ENC2 ในสภาวะไร้อากาศ	23
3	แสดงผลการทดสอบความทนกรดด่าง (ก.) และความทนเกลือน้ำดี (ข.) ของแบคทีเรีย ENC3 ในสภาวะไร้อากาศ	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันคนส่วนใหญ่ตื่นตัวหันมาสนใจสุขภาพตัวเองมากขึ้น เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารประเภทพร้อมบริโภค เนื่องจากอาหารประเภทนี้มีปริมาณสารอาหารในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม มีไขมันสูง รวมถึงมีการบริโภคผักผลไม้ที่น้อยลง (เอกลักษณ์, 2552) ส่งผลให้เกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคท้องผูก เป็นต้น (อัจฉรา, 2561) ดังนั้นผู้บริโภคจึงหันมาให้ความสนใจในการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเพื่อป้องกันหรือบรรเทาโรคภัยไข้เจ็บ ทำให้มีผลิตภัณฑ์สุขภาพหลากหลายชนิดขึ้น หนึ่งในนั้นคือผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก (กนกวรรณ และธิดารัตน์, 2555)

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค โดยช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค และลดระดับคอเรสเตอรอลในเลือด เป็นต้น (กาญจนา, 2556) นอกจากนี้แบคทีเรียโพรไบโอติกยังมีส่วนช่วยลดแลคโตสในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมโดยการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติก และสร้างแลคเตสซึ่งทำหน้าที่ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสด้วย ดังนั้นผลิตภัณฑ์นมที่มีโพรไบโอติกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภคที่แพ้แลคโตส (นริศรา, ม.ป.ป. ; Bayless. *et al*., 2017 ; Amorim. *et al*., 2018)

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่ามีการรายงานการพบจุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลเคปกูสเบอรี่ และพบว่ามีสารสกัดจากเคปกูสเบอรี่ที่ช่วยต้านการอักเสบในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ วิตามินซี วิตามินเค วิตามินบีรวม แคโรทีน มีไฟเบอร์สูง และที่เปลือกของเคปกูสเบอรี่มีเพคตินที่ทำให้รู้สึกอิ่มท้องนานขึ้น และช่วยให้ร่างกายได้มีเวลาในการดูดซึมสารอาหารที่จำเป็นนานขึ้นอีกด้วย (รัชนีและริน, 2554 ; Marin. *et al*., 2010 ; Ramadan, 2011 ; Castro. *et al*., 2015 ; Horti-Pride Pty Ltd, 2019) จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นนี้ทำให้มีความสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่เพื่อประเมินศักยภาพความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นที่จะสามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกเพิ่มเติมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่

2) เพื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่มาทำการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ ศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของจุลินทรีย์
2) ทราบถึงวิธีการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์
3) ทราบถึงวิธีทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โพรไบโอติก

รากศัพท์ของคำว่า "โพรไบโอติก (Probiotic)" มาจากภาษากรีกของคำว่า "โพร (pro)" และ "ไบโอทอส (biotos)" ซึ่งหมายถึง "สำหรับชีวิต (for life)" หรือ "ส่งเสริมชีวิต" ตรงข้ามกับคำว่า "แอนติไบโอติก (antibiotics)" ซึ่งหมายถึง "ต่อต้านชีวิต" หรือ "ปฏิชีวนะ" โดยยับยั้งหรือต่อต้านสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจหมายถึงจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค ส่วนโพรไบโอติกนั้นใช้เพื่อส่งเสริมสิ่งมีชีวิต คำว่า "โพรไบโอติก" นั้น ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Lilley และ Stillwell ในปี ค.ศ. 1965 (Suskovic. *et al.*, 2001 ; Vasiljevic and Shah, 2008)

แนวคิดเกี่ยวกับประโยชน์ของจุลินทรีย์ก่อนที่จะมาเป็นโพรไบโอติก เริ่มต้นจากแนวคิดของ Elie Metchnikoff ที่ถือว่าเป็น "บิดาของโพรไบโอติก" โดย Metchnikoff ได้สังเกตว่าประชากรชาวบัลแกเรียมีอายุยืน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงพฤติกรรมการบริโภคของชาวบัลแกเรียพบว่าชาวบัลแกเรียนิยมบริโภคนมหมักเป็นประจำทุกวัน ดังนั้นจึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าการที่ชาวบัลแกเรียบริโภคนมหมักในปริมาณมากเป็นประจำจึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้มีอายุยืนได้ จึงศึกษาจุลินทรีย์ในนมพบว่าจุลินทรีย์ชนิด *Lactobacilli* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกได้และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ดีหรือชนิดที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ช่วยป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรค และยังลดความเป็นพิษของสารที่เกิดจากแบคทีเรียที่มีการใช้โปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญ เช่น *Clostridia* ได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งทั้งหมดนี้จึงน่าจะเป็นสาเหตุในการส่งเสริมสุขภาพผู้บริโภคทำให้อายุยืน ในปี ค.ศ. 1906 ได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถหยุดยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio cholerae* ได้ ผลงานนี้ได้รับรางวัลโนเบล ในปี ค.ศ. 1908 นับว่าเป็นการจุดประกายการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ ตั้งแต่นั้นมาจนถึงปัจจุบัน (ไชยวัฒน์ และศศิธร, 2553 ; สุภัจฉรา, 2557 ; วันทนีย์, 2559)

2.1.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

คุณสมบัติที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับมนุษย์มีคุณสมบัติหลักๆ ดังนี้ (Allegany Nutrition, n.d. ; จินตกร, 2550 ; อรอนงค์, 2550 ; Yin & Zhang, 2005 ; ไชยวัฒน์ และศศิธร, 2553 ; ณัฐพัฒน์, 2554 ; ไชยวัฒน์, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) ความสามารถในการทนสภาวะความเป็นกรดด่างที่ระดับพีเอช 2 3 4 8 และ 9 ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหารส่วนบนที่ระดับพีเอช 4.0-6.5 กระเพาะอาหารส่วนล่างที่ระดับพีเอช 1.5-4.0 ลำไส้เล็กส่วนบนที่ระดับพีเอช 7.0-8.5 ลำไส้เล็กส่วนล่างและลำไส้ใหญ่ที่ระดับพีเอช 4.0-7.0 ทั้งนี้ความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าวบ่งบอกถึงความสามารถในการรอดชีวิตจากสภาวะความเป็นกรดด่างในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้

2) ความสามารถในการทนสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.15% และ 0.30% (w/v) จากการหลั่งเกลือน้ำดีจากตับสู่ลำไส้เล็ก

3) จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไร้อากาศ ทั้งนี้เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ยิ่งลึกลงไป ยิ่งมีปริมาณอากาศที่เบาบางหรือไร้อากาศเลย

4) ความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ การยึดเกาะของจุลินทรีย์โพรไบโอติกบนผนังลำไส้ในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกที่ช่วยป้องกันเชื้อก่อโรค กลไกการเกาะติดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบจำเพาะ แบบใช้แรงวาลเดอวาลล์ แบบใช้ประจุ และการจับกันของเซลล์กับตัวรับโดยการมีปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ โดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะมีพื้นผิวเซลล์บางส่วนที่ไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกบางชนิดยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิดออกมาบนผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มที่เป็นสารเคลือบเซลล์ เช่น คอลลาเจน ไฟโบรเนคติน และไวโทเนคติน นอกจากนี้ยังสามารถขัดขวางการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบริเวณตัวรับในเยื่อเมือกของลำไส้ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะสามารถยึดเกาะติดกับตัวรับดังกล่าวและเพิ่มจำนวนยึดครองบริเวณตัวรับดังกล่าวได้ ทำให้ตัวมันไม่ถูกกำจัดออกไปจากการบีบตัวของลำไส้เล็ก และยังป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคพวก *Salmonella typhimurium Yersinia enterocolitica* และ*Escherichia coli* เข้ามาเกาะจนทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารขึ้น ยกตัวอย่างเช่น *Lactobacillus plantarum* จะผลิตแอดฮีซินส์เพื่อไปจับกับน้ำตาลแมนโนสที่มีในลำไส้ทำให้ *E. coli* ที่ต้องการมาจับกับลำไส้โดยผ่านตัวรับนี้เพื่อก่อให้เกิดโรคถูกแย่งไป

5) ความสามารถในการผลิตสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยโพรไบโอติกจะผลิตสารแบคทีริโอซิน ซึ่งเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารบูดเสีย เช่น *Bacillus cereus Clostridium botulinum Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแบคทีริโอซินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ แบคทีริโอซินที่มีการศึกษามากที่สุด คือ ไนซินที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* โดยกลไกการออกฤทธิ์จะทำให้เกิดรู และขัดขวางกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน รวมทั้งรบกวนสมดุลของพีเอชเป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

1) การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่และระบบขับถ่าย จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่จะสร้างกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติก กรดทั้งสองมีการส่งเสริมฤทธิ์กัน โดยกรดอินทรีย์เหล่านี้จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เนื่องจากความสามารถในการละลายได้ในไขมัน (Bearso. *et al.*, 1997 ; Heyman, 2000) เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสซึมเกิดสภาวะที่เป็นกรดทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Salmond. *et al.*, 1984) นอกจากนี้กรดอินทรีย์จะมีผลยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ทำให้สามารถทำลายเซลล์หรือยับยั้งเซลล์จุลินทรีย์นั้นๆ (Fuller, 1989) และยังพบว่าการสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกของการเจริญลดลง และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด (Makinen & Bigret, 1998) จากตัวอย่างรายงานการใช้แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus rhamnosus* strain GG และ *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับ *Streptococcus thermophilus* (Isolauri. *et al.*, 1991 ; Oberhelman. *et al.*, 1999 ; Saavedra. *et al.*, 1994) เพื่อบรรเทาอาการท้องเสียในทารก โดยเฉพาะทารกที่ไม่ได้ดื่มนมมารดาพบว่าสามารถลดระยะเวลาและความรุนแรงของภาวะท้องเสียที่เกิดจากอาหารเป็นพิษได้และมีประสิทธิภาพดีในกลุ่มท้องเสียที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรตา (Guandalini. *et al.*, 2000) และในผู้ป่วยสูงอายุที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium difficile* ในลำไส้เล็ก หลังจากการได้รับยาปฏิชีวนะขณะพักรักษาตัวที่โรงพยาบาล (Souza. *et al.*, 2002 ; Huebner & Surawicz, 2006) นอกจากนี้โพรไบโอติก *Lactobacillus casei* strain Shirota และ *Bifidobacterium* BB536 สามารถช่วยป้องกันและลดภาวะท้องผูก โดยช่วยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของลำไส้ใหญ่ ช่วยเพิ่มความถี่ของการเคลื่อนไหวของลำไส้ใหญ่ และเพิ่มความนุ่มของอุจจาระ ช่วยให้ขับถ่ายได้คล่องขึ้น (Koebnick. *et al.*, 2003 ; Ogata. *et al.*, 1997)

2) ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด คลอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เกลือน้ำดี กลไกการลดคลอเลสเตอรอลโดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกเกิดจากกลไกการทำงานร่วมกัน โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถผลิตเอนไซม์ Bile Salt Hydrolase (BSH) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเกลือน้ำดีที่จับกับกรดอะมิโนได้เป็นเกลือน้ำดีอิสระ เกลือน้ำดีอิสระสามารถละลายได้น้อยกว่าเกลือน้ำดีที่จับกับกรดอะมิโนทำให้เกิดการดูดซึมกลับเข้าไปยังตับลดลง และยังสามารถผ่านผนังลำไส้และเข้าสู่กระแสเลือดได้หรือตกตะกอนทำให้สามารถขับออกทางอุจจาระได้ดี ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณของเกลือน้ำดีที่จะส่งกลับเข้าไปยังตับ และหมุนเวียนระหว่างตับกับลำไส้เพื่อทำหน้าที่ย่อยและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดซึมไขมันนั้นลดลง ดังนั้นน้ำดีจะต้องถูกสร้างขึ้นใหม่จากคลอเลสเตอรอลภายในตับจึงสามารถลดระดับคลอเลสเตอรอลภายในตับและลดระดับปริมาณคลอเลสเตอรอลที่จะส่งออกมาสู่กระแสเลือดได้ (Corzo & Gilliland, 1999. ; Tanaka. *et al.*, 1999 ; Knarreborg. *et al.*, 2002 ; Lim. *et al.*, 2004 ; Begley. *et al.*, 2006 ; Parvez. *et al.*, 2006 ; Sirilun. *et al.*, 2010)

3) ช่วยลดความดันโลหิต ปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจกับเชื้อ *Lactobacillus helveticus* พบว่านมที่หมักด้วย *L. helveticus* มีสารแลคโตไตรเปปไทด์คือเปปไทด์ที่พบในนมเปรี้ยว มี 2 ชนิด ได้แก่ valine-proline-proline (VPP) และ isoleucine-proline-proline (IPP) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก *L. helveticus* ไปย่อยโปรตีนเคซีนในนม แล้วทำให้เกิดไบโอแอคทีฟ เปปไทด์ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ความดันโลหิตลดลง (Nakamura. *et al.*, 1995 ; Turpeinen. *et.al.*, 2011) มีการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพที่พบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิตโดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme (ACE inhibitor) โดยไตรเปปไทด์ VPP และ IPP ส่งผลให้ความดันโลหิตลดลง เมื่อความดันโลหิตต่ำลง เซลล์พิเศษในไตจะตรวจพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว พร้อมกับปล่อยสารที่เรียกว่า Renin ออกสู่กระแสเลือด เพื่อทำการเปลี่ยน angiotensin ซึ่งเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ให้กลายเป็น Angiotensin I โดยจะทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงระดับความดันได้มากขึ้น เมื่อถูกเปลี่ยนให้เป็น Angiotensin II ซึ่งจะเกิดขึ้นในปอด โดยผ่านกระบวนการทำงานของ ACE 1 และ Angiotensin II เป็นฮอร์โมนออกฤทธิ์ที่เส้นเลือดโดยตรง ทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น นอกจากนั้นมันยังมีหน้าที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือกระตุ้นให้ปล่อยสาร aldosterone ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทำให้เส้นเลือดเกิดการหดตัว ทำให้ความดันโลหิตเพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมากและในขณะเดียวกัน aldosterone จะมีผลกระทบต่อการกรองเลือดของไต adosterone จะออกฤทธิ์ทำให้ไตเก็บกักทั้งเกลือและน้ำเอาไว้ไม่ให้ถูกขับออกจากร่างกาย นำมาซึ่งการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง (ศุภนิมิต, ม.ป.ป. ; Nakamura. *et al.*, 1995 ; Masuda. *et al.*, 1996 ; Nakamura. *et al.*, 1996)

4) ยับยั้งการสร้างสารก่อมะเร็ง และต่อต้านการเกิดมะเร็ง โดยพบว่าเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้ สายพันธุ์นี้มีชื่อย่อว่า LB-51 ซึ่งเป็นสารมีฤทธิ์ป้องกันมะเร็ง นอกจากนี้เกลือไนเตรท และไนไตรท์ที่ใช้ป้องกันการเน่าเสียในอาหารบางชนิด เช่น เบคอน แหนม แฮม ซึ่งคาดว่าอาจเป็นสารก่อมะเร็ง เนื่องจากเมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ชื่อว่า ไนโตรซามีน ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดมะเร็งได้ พบว่าแลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์สามารถทำลายไนโตรซามีนได้ (เอกลักษณ์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เคปกูสเบอรี่

2.2.1 ลักษณะของเคปกูสเบอรี่

เคปกูสเบอรี่ส่วนใหญ่ที่นำมาบริโภคคือสายพันธุ์ *Physalis peruviana* L. เป็นไม้ล้มลุกกึ่งไม้เตี้ยยืนต้น ผลจะถูกห่อหุ้มด้วยกลีบเลี้ยง เมื่อแก่เต็มที่ผลจะมีสีเหลืองปนส้ม เนื้อด้านในจะเห็นเป็นสีเหลือง รสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นหอม มีถิ่นกำเนิดอยู่ในกึ่งเขตร้อน และเป็นพืชในตระกูลมะเขือ เป็นที่รู้จักกันในนามโทงเทงฝรั่ง มีสี รสชาติ รูปร่าง ดอก ความสูง และขนาดที่แตกต่างกันตามภูมิภาคและประเทศที่แตกต่างกัน มีถิ่นกำเนิดมาจากโคลัมเบีย เคนยา และแอฟริกาใต้ ซึ่งปัจจุบันได้รับการเพาะพันธุ์และนำไปปลูกในหลายๆประเทศทั่วโลก (Karent & Edison, 2015) ในประเทศไทยนิยมปลูกเคปกูสเบอรี่ทางภาคเหนือมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Giallo rosso, Giant, Giant poha berry และ Golden berry (การสัมภาษณ์ส่วนตัว, 2 พฤษภาคม 2562)

2.2.2 ประโยชน์ของเคปกูสเบอรี่

1) มีวิตามินเอ แคโรทีน ช่วยในการบำรุงสายตา ช่วยทำให้การมองเห็นดีขึ้นในเวลากลางคืน โดยเคปกูสเบอรี่ปริมาณ 100 กรัม จะมีวิตามินเออยู่ 346 RE. และมีแคโรทีน 1613 มิลลิกรัม (นิคม, 2552 ; HonestDocs, 2562)

2) มีวิตามินบี 1 มีส่วนสำคัญในการส่งเสริมการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะการนำกระแสประสาท ช่วยเพิ่มการเผาผลาญสารอาหารโดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต ช่วยบำรุงผิว เส้นผม และสมอง ป้องกันโรคเหน็บชา โดยเคปกูสเบอรี่ปริมาณ 100 กรัม จะมีวิตามินบี 1 อยู่ 101 มิลลิกรัม (นิคม, 2552 ; HonestDocs, 2562)

3) มีวิตามินบี 2 ช่วยในการเผาผลาญไขมัน เสริมสร้างเส้นผม ช่วยบำรุงผิว บำรุงเลือด และบำรุงสมอง ทั้งยังมีส่วนช่วยในการทำงานของสายตา โดยเฉพาะบริเวณเรตินาของลูกตา โดยเคปกูสเบอรี่ปริมาณ 100 กรัม จะมีวิตามินบี 2 อยู่ 170 มิลลิกรัม (นิคม, 2552 ; HonestDocs, 2562)

4) มีสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบไปด้วยวิตามินซี ช่วยบำรุงผิวพรรณ ช่วยกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในชั้นผิว มีรายงานการวิจัยที่พบว่าแอนโทไซยานินในเคปกูสเบอรี่สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ประเภท HT-29 และ HCT-116 และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (HonestDocs, 2562 ; ศูนย์พัฒนาพื้นที่สูง กรมอนามัย, ม.ป.ป.)

5) มีวิตามินเค ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการแข็งตัวของเลือด ป้องกันภาวะเลือดไหลมากจนเกินไป (HonestDocs, 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) ที่เปลือกของเคปกูสเบอรี่มีเพคติน ซึ่งช่วยให้ลำไส้ทำงานได้ดีช่วยให้รู้สึกอิ่มท้องนานขึ้น และช่วยให้ร่างกายได้มีเวลาในการดูดซึมสารอาหารที่จำเป็นนานขึ้นอีกด้วย (รัชนี และริน, 2554)

7) มีไฟเบอร์สูง ช่วยลดอาการท้องผูก สำหรับไฟเบอร์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำจะเข้าไปทำหน้าที่เหมือนเป็นตัวกระตุ้นระบบขับถ่าย ช่วยให้ลำไส้บีบตัวเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น โดยเคปกูสเบอรี่ปริมาณ 100 กรัม จะมีไฟเบอร์อยู่ 400 มิลลิกรัม (HonestDocs, 2562)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Erkkila and Petaja (2000) ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเนื้อและทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเนื้อทั้ง 8 ชนิด โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเนื้อทุกชนิด ชนิดละสายพันธุ์ เมื่อทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่คล้ายคลึงกับกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ โดยทดลองในสภาวะที่คล้ายคลึงกับกระเพาะอาหารมีค่าพีเอช 1-5 ภายในสภาวะที่คล้ายคลึงกับลำไส้เล็กมีค่าพีเอช 4-7 และเกลือน้ำดีมีความเข้มข้น 0.15% และ 0.30% พบว่ามีเพียงสองสายพันธุ์จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเนื้อที่แตกต่างกันสองชนิด ได้แก่ *Lactobacillus sake* ที่ได้จาก RM 10/Bactoferm T-RM-10 และ *Pediococcus acidilactici* ที่ได้จาก RM 2000/Bactoferm T-RM-2000 ทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการทนกรดด่างตั้งแต่พีเอช 3 ขึ้นไป และสามารถทนเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 0.15% และ 0.30% ได้

Duangjitcharoen, *et al.* (2008) ทำการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์หมักจากผักและผลไม้ ทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกโดยทดสอบความสามารถในการทนกรดด่างที่พีเอช 2 3 4 5 8 9 และทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 0.15% และ 0.30% หลังการทดสอบพบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท คือ SS2 ที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดด่าง ของ SS2 กับ *Lactobacillus casei* จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมพบว่าทั้งสองเชื้อสามารถทนได้ที่พีเอช 3 และ 4 แต่มีเพียง SS2 ที่สามารถทนได้ที่พีเอช 8 และผลการทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีพบว่าทั้งสองเชื้อสามารถทนที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.15% และ 0.30% ได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุลพบว่า SS2 คือ *Lactobacillus plantarum* ผลจากงานวิจัยนี้สามารถพัฒนา SS2 ไปเป็นเชื้อตั้งต้นในการใช้เป็นโพรไบโอติกในเครื่องดื่มพืชหมักต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1) หม้อนึ่งแรงดันไอ (Tomy ES-315 & Hirayama HVE50)
2) ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Memmert IN 110)
3) ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Contherm thermotec 2000 oven)
4) ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส (Shel-Lab sheldon manufacturing)
5) Spectrophotometer (Genesys 10s uv-vis spectrophotometer)
6) ตู้ปลอดเชื้อ
7) ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Thermo Scientific)
8) เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Adventurer ohaus)
9) เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Pioneer ohaus)
10) เครื่องวัดค่าพีเอช (Mettler toledo)
11) กระดาษทดสอบพีเอช (MColorpHast)
12) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Nikon, E200)
13) Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14) เครื่องปั่นผสม (Scientific industries vortex genie 2)
15) ไมโครปิเปต ขนาด 200 ไมโครลิตร และขนาด 1000 ไมโครลิตร
16) ทิป ขนาด 200 ไมโครลิตร และขนาด 1000 ไมโครลิตร
17) ปากคีบ
18) มีดผ่าตัด
19) ลวดเขี่ยเชื้อ
20) Anaerobic jar
21) Anaerobic Pack (AnaeroPack-Anaero, MGC)
22) เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ขนาด 250 มิลลิลิตร ขนาด 500 มิลลิลิตร และขนาด 1000 มิลลิลิตร ขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร ขนาด 500 มิลลิลิตร และขนาด 1000 มิลลิลิตร กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ขนาด 250 มิลลิลิตร ขนาด 500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร และขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิเปตแก้วขนาด 1 มิลลิลิตร ขนาด 5 มิลลิลิตร และขนาด 10 มิลลิลิตร แท่งแก้วคนสาร แท่งแก้วตัวแอล กระจกสไลด์ หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

23) อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไฟแช็ก ลูกยาง ถุงพลาสติก กระดาษทิชชู่ เข็มเขี่ยเชื้อ ไมโครเวฟ พาราฟิล์ม และแรปใส

3.2 สารเคมี

1) เอทธิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v)
2) เอทธิลแอลกอฮอล์ 95% (v/v)
3) สารละลายคลอรอกซ์ 5% (v/v)
4) น้ำมันพาราฟิน (Ajax Finechem, Labchem)
5) โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์
6) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5% (w/v)
7) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
8) กรดไฮโดรคลอริก 3 นอร์มอล
9) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% w/v (Siribuncha)
10) สายละลายบรอมไทมอลบลู (Ajax Finechem, Labchem) 0.2% (w/v)
11) สารละลายคริสตัลไวโอเลต
12) สารละลายแกรมไอโอดีน
13) สายละลายซาฟานิน โอ
14) กลีเซอรอล 20% (v/v)
15) Tween80 0.01% (v/v)
16) อาหาร Lactobacillus MRS broth – MRS (Himedia)
17) อาหาร Brain heart infusion – BHI (Bacto, BD)
18) อาหาร Trypticase Soy Broth – TSB (Bacto, BD)
19) อาหาร Nutrient broth – NB (Himedia)
20) Agar – Agar powder (Bio Agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เชื้อแบคทีเรีย

1) *Esherichia coil*

2) *Pseudomonas aeruginosa*

3) *Bacillus subtilis*

3.4 ตัวอย่างผลไม้

เคปกูสเบอรี่

3.5 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่

3.5.1.1 การคัดเลือกเคปกูสเบอรี่

เลือกผลเคปกูสเบอรี่ที่มีลักษณะผลสมบูรณ์ ไม่มีรอยแผล ไม่มีรอยช้ำ มีขนาดใกล้เคียงกัน

3.5.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อ

นำผลเคปกูสเบอรี่ที่มีลักษณะดังข้างต้นไปทำความสะอาดด้วยน้ำประปาไหลผ่านให้สะอาด เพื่อชะล้างสารเคมีตกค้างและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบริเวณผิวออก (มงคลศิริจันทร์และคณะ., 2559) จากนั้นำผลเคปกูสเบอรี่แช่ในเอทานอล 95 % ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที เขย่าเบาๆ แล้วนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 5 % (v/v) ที่ผสมด้วย 0.01% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาทีและเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นนำไปแช่ในเอทานอล 95 % ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปล้างโดยนำไปแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำไปซับให้แห้งด้วยทิชชู่ปลอดเชื้อ (Roland M. Hipol*et al.*,2014 และRania Aydi Ben Abdallah *et al.*,2016)

3.5.1.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำผลเคปกูสเบอรี่ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไป vortex เป็นเวลา 1 นาที ทำทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการเทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้จากความขุ่นที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว MRS ทุกๆ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งครบเวลา 144 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้วนำอาหารเหลว MRS มาเกลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Hernan *et al.*, 2017) ลงบนผิวห้าอาหารแข็ง MRS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทั้ง 10 เพลท แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศ โดยบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือไม่ นำเพลทที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate บนอาหารแข็งMRS บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการสังเกตลักษณะโคโลนีและเลือกโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูการติดสี รูปร่างและการเรียงตัวพร้อมบันทึกผล

3.5.1.4 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

หลังจากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่ทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยการปิเปตอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลความเข้มข้นเท่ากับ 20% (v/v) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงไปใน Microcentrifuge tube แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

3.5.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่ลงบนอาหารแข็งMRS BHI และ TSA ด้วยวิธีstreak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารที่แตกต่างกันและระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญทุกๆ 24 ชั่วโมง

3.5.3 การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.5.3.1 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่ลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธีstreak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ นำเพลทที่ได้เชื้อบริสุทธิ์มาสังเกตลักษณะโคโลนี โดยดู ขนาด สี ขอบ ความนูน ของโคโลนี

3.5.3.2 การติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัว

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็งBHI ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศจากนั้นหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งBHI แล้วมาผสมกับหยดน้ำกลั่นและเกลี่ยเป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาทีล้างออกด้วยน้ำกลั่นจากนั้นหยดสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาทีล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งและหยดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % (v/v) เพื่อล้างสี และล้างด้วยน้ำกลั่นทันทีจากนั้นหยดสารละลายซาฟรานินโอทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้ายทิ้งไว้ให้แห้งหรือนำกระดาษทิชชู่ซับให้แห้งแล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1000 เท่า พร้อมทั้งบันทึกผลลักษณะรูปร่างการเรียงตัวและการติดสี

3.5.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.5.4.1 การทดสอบการสร้างของเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงบนหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อยู่บนสไลด์ แล้วสังเกตการเกิดฟองแก๊สภายใน 1 นาทีหลังทำปฏิกิริยา ถ้าเกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase positive)

3.5.4.2 OF test (Oxidation Fermentation test)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งBHI มาเพาะลงในอาหารเหลวBHI ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติม Dextrose ให้มีความเข้มข้น ของ Dextrose สุดท้ายเป็น 1% โดยทำการทดสอบเชื้อละ 2 หลอด และนำไปบ่มโดยบ่มใน 2สภาวะ หนึ่งหลอดบ่มในสภาวะไร้อากาศอีกหนึ่งหลอดบ่มในสภาวะที่มีอากาศ โดยหลอดที่บ่มในสภาวะไร้อากาศจะมีการเททับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดผิวหน้าอาหาร จากนั้นบ่มทั้งสองหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้เชื้อ *Esherichia coil* *Pseudomonas aeruginosa* และ*Bacillus subtilis* เป็นเชื้อควบคุม เพื่อเปรียบเทียบผลให้กับเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากนั้นตรวจผลด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารและสังเกตการเกิดแก๊สจากฟองที่เกิดในหลอดดักแก๊ส

3.5.5 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

3.5.5.1 การทนกรด

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ที่ใช้ในการทดสอบ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงอาหารเหลวBHI ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศโดยเททับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดผิวหน้าอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครบเวลาแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 (Wongsariya.*et al*, 2013) แล้วปิเปตเชื้อแบคทีเรียข้างต้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงอาหารเหลวBHI ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เชื้อทดสอบ 1 สายพันธุ์จะทดสอบความสามารถการทนกรดด่างจำนวน 5 หลอด โดยแต่ละหลอดจะมีค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 2 3 4 8และ9 ตามลำดับ (ไชยวัฒน์, 2556) แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการเทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่ใช้แต่ละหลอดทดสอบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงอาหารเหลว BHI พีเอช 7.4 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และบ่มต่อไปในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น600 นาโนเมตร ทุกๆ 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ผ่าการทดสอบแต่ละพีเอช และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมSPSS ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียวหรือมีปัจจัยเดียวและนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีLeast Significance Difference (LSD) (วราพร, 2555) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (อุษณีย์, 2554)

3.5.5.2 การทนเกลือน้ำดี

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ที่ใช้ในการทดสอบ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงอาหารเหลวBHI ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศโดยเททับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดผิวหน้าอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 (Wongsariya.*et al*, 2013) แล้วปิเปตเชื้อแบคทีเรียข้างต้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงอาหารเหลว BHI ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เชื้อทดสอบ 1 สายพันธุ์จะทดสอบความสามารถการทนเกลือน้ำดี จำนวน 2 หลอด โดยแต่ละหลอดจะมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีตั้งแต่ 0.15 % และ 0.30 % ตามลำดับ (Taheri *et al*, 2009) แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการเทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่ใช้แต่ละหลอดทดสอบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงอาหารเหลวBHI พีเอช 7.4 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และบ่มต่อไปในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น600 นาโนเมตร ทุกๆ 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ผ่าการทดสอบแต่ละพีเอช และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมSPSS ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียวหรือมีปัจจัยเดียวและนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีLeast Significance Difference (LSD) (วราพร, 2555) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (อุษณีย์, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเคปกูสเบอรี่และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากเคปกูสเบอรี่ โดยใช้วิธี spread plate บนอาหารแข็ง MRS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ พบว่า แต่ละแบคทีเรียมีลักษณะกลมขนาดเล็ก สีขาวขุ่น มันวาว โค้งนูน และเมื่อนำมาย้อมแกรมแล้วสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อดูรูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรีย พบว่า ENC1 เซลล์มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่สอง ในขณะที่ ENC2 มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และ ENC3 มีรูปร่างเป็นท่อนยาว ทั้งคู่มีลักษณะแยกเป็นเซลล์เดี่ยวกันอย่างอิสระ (ตารางภาคผนวก ค.1) และแบคทีเรียทั้งหมด 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจากการติดสีม่วงของ crystal violet (ตารางภาคผนวก ค.2) โดยลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งเป็นผลมาจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดความแตกต่างกัน ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* (Himedia, 2015) ค่าพีเอช อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มที่จัดเป็นข้อจำกัดในการเจริญของแบคทีเรีย (นฤมล, 2019)

4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ

จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่บนอาหารแข็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ MRS BHI และ TSA ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ หลังผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้แก่ แบคทีเรีย ENC1 และ ENC3 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ โดยไม่มีความแตกต่างกันจากการสังเกตและเปรียบเทียบด้วยตาเปล่า ในขณะที่แบคทีเรีย ENC2 สามารถเจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ แต่เจริญได้ช้ากว่าในสภาวะที่มีอากาศ โดยพบว่าแบคทีเรีย ENC2 ใช้ระยะเวลาในการเจริญในสภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 48 ชม. และในสภาวะที่มีอากาศ ใช้ระยะเวลานานถึง 168 ชม. กว่าที่แบคทีเรียจะเจริญบนผิวหน้าอาหาร โดยลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Facultative anaerobe โดยในสภาวะที่มีอากาศแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจและในสภาวะไร้อากาศแบคทีเรียจะทำการเปลี่ยนระบบเมตาบอลิซึมในรูปการหมัก (Mangkorn R., 2015)

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่บนอาหารแข็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ MRS BHI และ TSA ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	เวลา (ชม.)	ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย					
		ENC1		ENC2		ENC3	
		มีอากาศ	ไร้อากาศ	มีอากาศ	ไร้อากาศ	มีอากาศ	ไร้อากาศ
MRS	24	✓	-	-		✓	-
	48	✓	✓	-	✓	✓	✓
	72	✓	✓	-	✓	✓	✓
	96	✓	✓	-	✓	✓	✓
	120	✓	✓	-	✓	✓	✓
	144	✓	✓	-	✓	✓	✓
	168	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BHI	24	✓	✓	-		✓	-
	48	✓	✓	-	✓	✓	✓
	72	✓	✓	-	✓	✓	✓
	96	✓	✓	-	✓	✓	✓
	120	✓	✓	-	✓	✓	✓
	144	✓	✓	-	✓	✓	✓
	168	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TSA	24	✓	✓	-		✓	-
	48	✓	✓	-	✓	✓	✓
	72	✓	✓	-	✓	✓	✓
	96	✓	✓	-	✓	✓	✓
	120	✓	✓	-	✓	✓	✓
	144	✓	✓	-	✓	✓	✓
	168	✓	✓	✓	✓	✓	✓

หมายเหตุ : ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย

✓ สามารถเจริญได้ - ไม่สามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการทดสอบทางชีวเคมี

4.3.1 การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test)

จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสของแบคทีเรียทั้งหมด 3 ไอโซเลท ที่แยกได้จากเคปกูสเบอรี่ พบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลทของแบคทีเรีย ENC2 และ ENC3 ที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้ ในขณะที่แบคทีเรีย ENC1 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้ (ตารางภาคผนวก ค.3) ซึ่งการเกิดฟองแก๊สจะแสดงถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลสของแบคทีเรีย เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศจะพบการสร้างสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเพอรอกซิโซมในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดไขมัน โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะหลั่งเอนไซม์คะตาเลสออกมาย่อยสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เพื่อป้องกันการเป็นอันตรายต่อเซลล์ (ลัดดาภรณ์., ม.ป.ป.) และในกรณีแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ โดยไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. (Rachel Watson., n.d.) และช่วงอายุของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบควรมีอายุอยู่ในช่วง 18-24 ชม. เพราะหากเชื้อมีอายุมากเกินไปจะให้ผลเป็น false negative นอกจากนี้เชื้อบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่สามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เล็กน้อย โดยเกิดฟองแก๊สอย่างช้าๆ ซึ่งอาจทำให้ผลที่ได้เป็น false positive (Sagar Aryal., 2015)

4.3.2 การทดสอบ O-F test (Oxidation fermentation of glucose test)

การศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไร้อากาศ โดยในสภาวะที่มีอากาศ เรียกว่า ออกซิเดชันและในสภาวะไร้อากาศ เรียกว่า เฟอร์เมนเตชัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสังเกตการสร้างกรดจากการเปลี่ยนสีบอมไทมอลบลูในอาหารเหลว (Hugh and Leifson'n O-F medium) ถ้าแบคทีเรียสามารถร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสได้ สีบอมไทมอลบลูในอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสังเกตุการเกิดฟองแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ผลการศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียในสภาวะ ออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน แสดงดังในตารางที่ 2 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสได้ทั้งในสภาวะออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน ทำให้สีบอมไทมอลบลูในอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ซึ่งมีเพียงแบคทีเรีย ENC2 ที่สามารถสร้างแก๊สได้ (ตารางภาคผนวก ค.4) เนื่องจากกระบวนการหมักเป็นการเปลี่ยนแปลงกลูโคสให้เกิดพลังงาน โดยเป็นกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายกลูโคสหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ ตามเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย โดยมีสารอินทรีย์เป็นตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ทำให้กลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดและพลังงาน ซึ่งต่างจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจนที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ได้เป็นกรดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และจะได้พลังงานเกิดขึ้น (อัจฉรา, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลการสอบ O-F test (Oxidation fermentation test) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่

แบคทีเรีย	เวลาที่ใช้บ่ม (ชม.)	การสร้างกรด		การเปลี่ยนแปลงของสี		การเกิดแก๊ส	รูปแบบการสร้างกรด
		สภาวะที่มีอากาศ	สภาวะไร้อากาศ	สภาวะที่มีอากาศ	สภาวะไร้อากาศ		
ENC1	48	+	+	Y	Y	-	O F
ENC2	48	+	+	Y	Y	+	O F
ENC3	48	+	+	Y	Y	-	O F
Bacillus subtilis *	24	+	+	Y	Y	-	O F
Pseudomonas aeruginosa *	48	+	-	Y/G	G	-	O
Escherichia coli *	24	+	+	Y	Y	+	O F

หมายเหตุ : การสร้างกรด + = สร้างกรด - = ไม่สร้างกรด
การเปลี่ยนแปลงของสี Y = สีเหลือง Y/G = สีเหลืองปนเขียว G = สีเขียว
การเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส + = เกิดแก๊ส - = ไม่เกิดแก๊ส
รูปแบบการสร้างกรด O = Oxidation F = Fermentation
* คือ แบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวควบคุมสภาวะในการทดสอบ

4.4 ผลการศึกษาการทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก

4.4.1 การทดสอบความสามารถในการทนกรดด่างและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดแยกจากเคปกูสเบอรี่

จากผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดด่างและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดแยกจากเคปกูสเบอรี่ ในสภาวะไร้อากาศ ดังในตารางที่ 4.4.1 พบว่า แบคทีเรีย ENC1 สามารถทนความเป็นกรดที่ค่าพีเอช 4 แต่ไม่สามารถทนความเป็นกรดที่ค่าพีเอช 2 3 และทนความเป็นด่างที่ค่าพีเอช 8 และ 9 ดังรูปที่ 1 (ก.) โดยแบคทีเรีย ENC2 สามารถทนความเป็นด่างที่ค่าพีเอช 8 และ 9 แต่ไม่สามารถทนความเป็นกรดที่มีค่าพีเอช 2 3 และ 4 ได้ ดังรูปที่ 2 (ก.) ในขณะที่แบคทีเรีย ENC3 สามารถทนความเป็นกรดด่างได้ดีตั้งแต่ค่า pH 2 ถึง 4 และทนความเป็นด่างที่ค่าพีเอช 8 และ 9 ดังรูปที่ 3 (ก.) และความสามารถทนเกลือน้ำดี พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบสามารถทนเกลือน้ำดีได้ในทุกระดับความเข้มข้น ดังรูปที่ 1 2 และ 3 (ข.) และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระว่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียวและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significance Difference (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

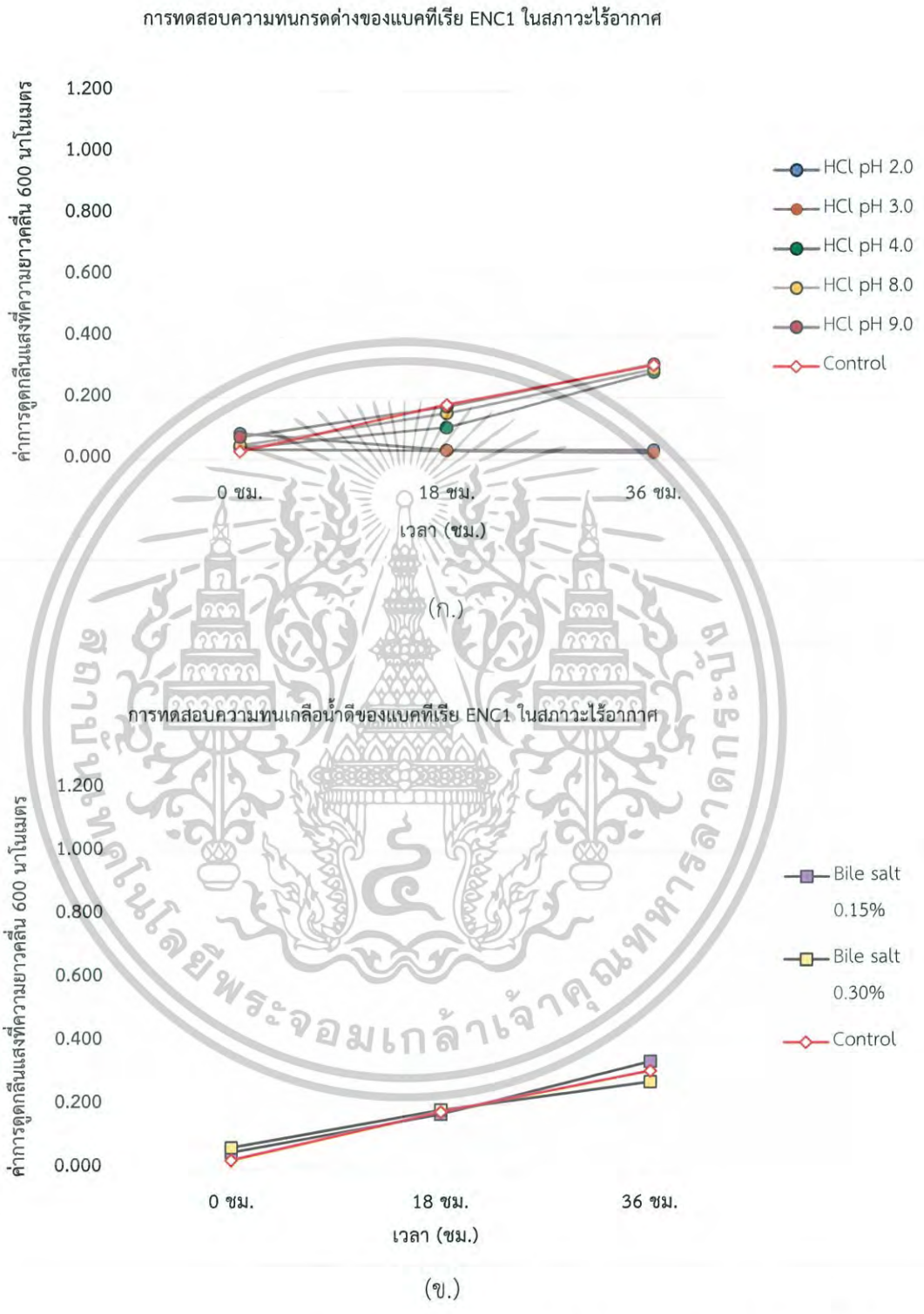
ประชากรได้ครั้งละหลายคู่ (วราพร, 2555) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (อุษณีย์, 2554) ดังแสดงในตาราง ภาคผนวก ง.โดยแบคทีเรีย ENC3 สามารถทนกรดด่างได้ดีกว่าแบคทีเรีย ENC1 และ ENC2 ที่ระดับพีเอช 2 3 4 8 และ 9 ตามลำดับ จากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงโดยมีการเจริญสูงสุดที่ 0.115 0.055 0.251 0.434 และ 0.382 ตามลำดับ และสามารถทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.15% ได้ดีกว่าแบคทีเรีย ENC1 และ ENC2 จากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงโดยมีการเจริญสูงสุดที่ 0.569 แต่ในระดับความเข้มข้น 0.30% เชื้อแบคทีเรีย ENC2 สามารถเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย ENC1 และ ENC3 จากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงโดยมีการเจริญสูงสุดที่ 0.688 โดยความสามารถในการทนกรดด่างของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่เป็นปัจจัยสำคัญของคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากคุณสมบัตินี้มีความสัมพันธ์กับสภาวะที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตผ่านไปถึงกระเพาะอาหารได้ ซึ่งภายในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 2.5 – 3.5 การที่กระเพาะอาหารค่าความเป็นกรดเนื่องจากมีการสร้างกรดไฮโดรคลอริก(กรดเกลือ) เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เปปซิน ซึ่งเมื่อเรารับประทานอาหารเข้าไป อาหารจะสามารถอยู่ในกระเพาะอาหารประมาณ 3-4 ชั่วโมง จุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารที่เข้าสู่ร่างกายและไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะเป็นกรดได้จะถูกทำลายเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรค เมื่อเรารับประทานอาหารเข้าไปจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหารสูงขึ้นอยู่ที่ประมาณ 3.0-4.5 แบคทีเรียที่ปนเปื้อนเข้าไปด้วยจะปกป้องตัวเองจากสภาวะความเป็นกรดโดยจะจับกับองค์ประกอบในอาหาร และหลังจากการย่อยเสร็จสิ้นแล้วสารอาหารจะเคลื่อนที่ไปยังลำไส้เล็กที่มีความเป็นด่างในระดับค่า pH ประมาณ 8 ถึง 9 ซึ่งการทนในสภาวะความเป็นกรดด่างของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับความสามารถในการปรับระดับความเป็นกรดด่างให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนเมมเบรนของแบคทีเรีย และความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่มีความสัมพันธ์กับสภาวะที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตภายในลำไส้เล็กได้ เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ดีควรมีความสามารถในการย่อยสลายเกลือน้ำดีเอนไซม์ bile salt hydrolase เพื่อให้รอดในระบบทางเดินอาหารได้ กิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase มักตรวจพบในกลุ่มแบคทีเรีย Lactobacillus และ Enterococcus การที่แบคทีเรียมีกิจกกรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase จะช่วยให้ต้านทานความเป็นพิษจากการรวมตัวของเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมและเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญภายในลำไส้ (มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2552 ; ไชยวัฒน์, 2556) แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบความเป็นโพรไบโอติกยังต้องการการทดสอบเพื่อยืนยันการเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก เช่น ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่ ความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหาร ความสามารถในการย่อยเกลือน้ำดี นอกจากนี้ควรมีการระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับความเป็นโพรไบโอติกโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุลควบคู่กับการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติความสามารถเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่ โดยการทดสอบความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี

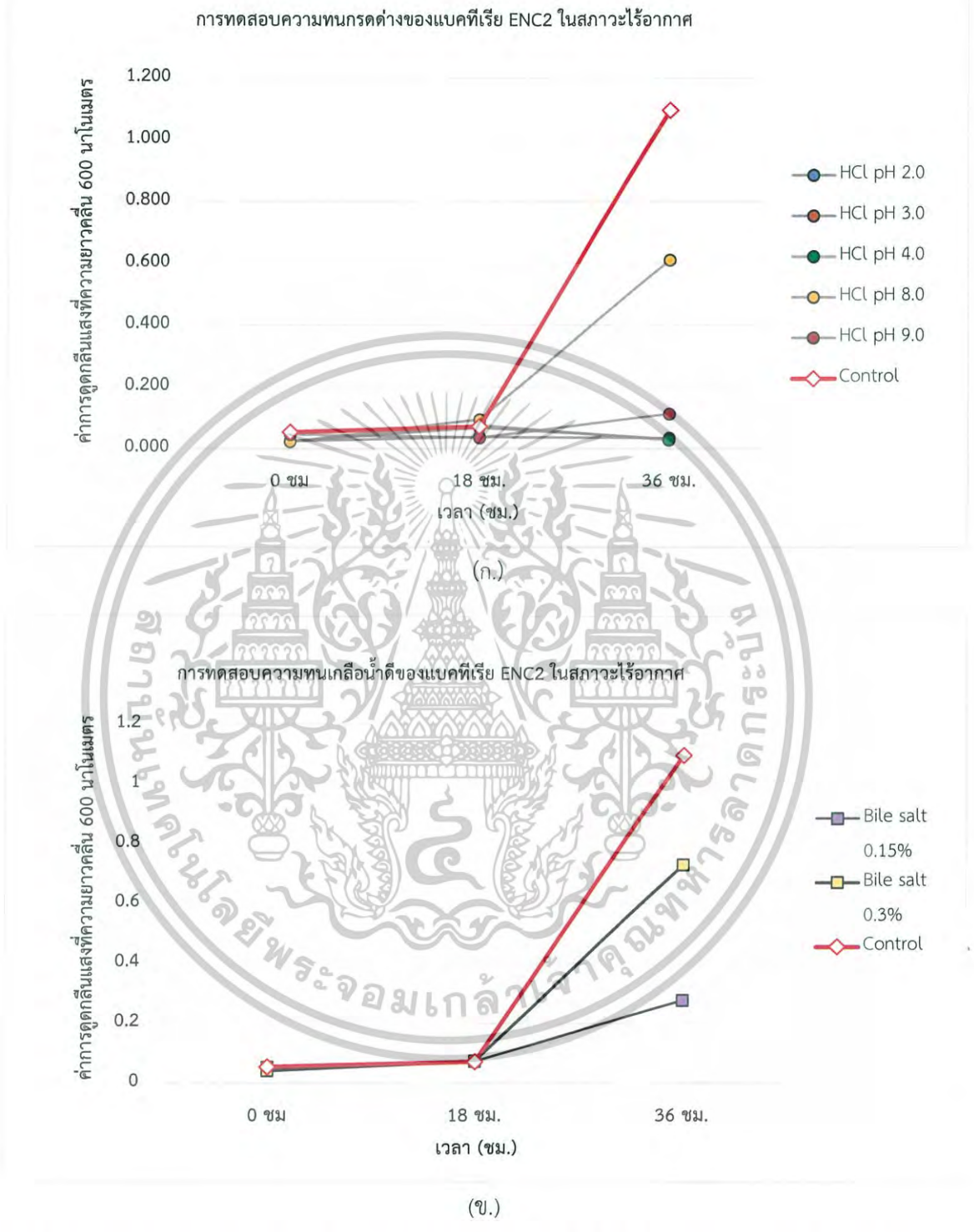
แบคทีเรีย		ENC1			ENC2			ENC3		
การทดสอบ		ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ที่ (OD = 600 nm) ณ ช่วงเวลาต่างๆ (ชม.)			ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ที่ (OD = 600 nm) ณ ช่วงเวลาต่างๆ (ชม.)			ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ที่ (OD = 600 nm) ณ ช่วงเวลาต่างๆ (ชม.)		
		0	18	36	0	18	36	0	18	36
ความทนกรดด่าง	pH 2.0	0.084	0.030	0.031	0.025	0.038	0.035	0.044	0.156	0.159
	pH 3.0	0.032	0.028	0.021	0.025	0.068	0.032	0.046	0.074	0.101
	pH 4.0	0.037	0.104	0.284	0.023	0.076	0.028	0.044	0.160	0.295
	pH 8.0	0.045	0.150	0.294	0.022	0.095	0.036	0.049	0.414	0.483
	pH 9.0	0.073	0.172	0.311	0.046	0.036	0.113	0.040	0.425	0.422
ความทนเกลือน้ำดี	ความเข้มข้น 0.15 %	0.050	0.171	0.337	0.054	0.073	0.277	0.043	0.356	0.612
	ความเข้มข้น 0.30 %	0.065	0.184	0.273	0.042	0.075	0.730	0.032	0.203	0.422
ค่าการดูดกลืนของแบคทีเรีย (OD = 600 nm) ในกลุ่มควบคุม ณ ช่วงเวลาต่างๆ (ชม.)		0.026	0.179	0.308	0.055	0.073	1.097	0.209	0.515	0.409

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



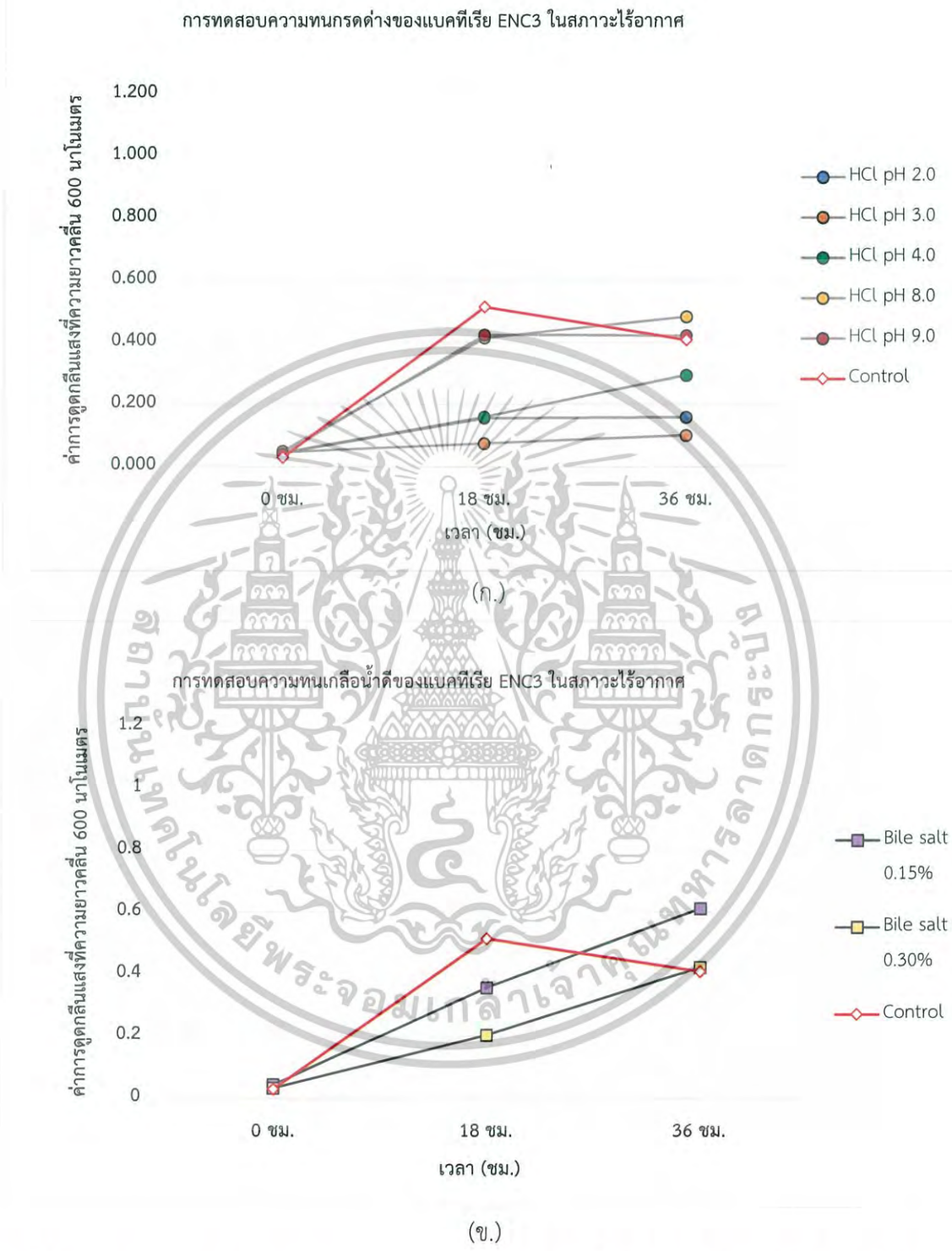
รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบความทนกรดด่าง (ก.) และทนเกลือน้ำดี (ข.) ของแบคทีเรีย ENC1 ในสภาวะไร้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบความทนกรดด่าง (ก.) และทนเกลือน้ำดี (ข.) ของแบคทีเรีย ENC2 ในสภาวะไร้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบความทนกรดด่าง (ก.) และทนเกลือน้ำดี (ข.) ของแบคทีเรีย ENC3 ในสภาวะไร้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากเคปกูสเบอรี่สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 3ไอโซเลทได้แก่แบคทีเรีย ENC1 ENC2 และENC3 โดยลักษณะของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเมื่อเจริญบอาหารแข็ง BHI มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว โค้งนูน เป็นแกรมบวกทั้ง 3 ไอโซเลท โดยไอโซเลทของ แบคทีเรีย ENC1 มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่สอง แบคทีเรีย ENC2 มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวและแบคทีเรีย ENC3 รูปร่างเป็นแท่งเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe และแบคทีเรีย ENC2และENC3 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีรูปแบบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลกลูโคสทั้งแบบออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน โดยมีเพียงแบคทีเรีย ENC2 ที่สามารถสร้างแก๊สได้ และแบคทีเรีย ENC3 สามารถทนกรดด่างและเกลือน้ำดีได้ดีที่สุด ดังนั้นแบคทีเรีย ENC3 จึงมีแนวโน้มเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก

5.2 ข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากเคปกูสเบอรี่เพื่อให้งานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้นควรมีการทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเพิ่มเติม ได้แก่ ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่ ความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหาร ความสามารถในการย่อยเกลือน้ำดี นอกจากนี้ควรมีการระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับความเป็นโพรไบโอติกโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุลควบคู่กับการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ หิรัณย์ภิญโญภาศ และธิดารัตน์ อดุลยธรรม. 2555. "โพรไบโอติกโยเกิร์ตพร้อมดื่มรสผลไม้." โครงงานพิเศษ ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. "การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่." ปริญญานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

จินตกร. 2550. "โพรไบโอติกส์คืออะไร." *Chulalongkorn Dental Journal.* 18 : 208-211.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริลุน. 2553. "โพรไบโอติก : จุลินทรีย์ที่เป็นเป็นประโยชนต่อสุขภาพ." *วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก.* 3(3) : 4-12.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต, ผู้ช่วยศาสตราจารย์. 2556. **โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ.** สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์. 2554. "การประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่." วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิคม วงค์นันตา. 2552, 24 พฤศจิกายน. "เคพกูสเบอรี่ผลไม้ดีเพื่อสุภาพ." **ไทยนิวส์.**

นริศรา สุรทานต์นนท์, แพทย์หญิง ให้สัมภาษณ์, ม.ป.ป. Meadjohnson ผู้สัมภาษณ์. **บทสัมภาษณ์คุณหมอ เรื่องการดูแลเด็กที่มีอาการแพ้แลคโตส.**

นฤมล มาแทน. 2562. **ปัจจัยที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต.** [Online]. Available : https://essentialoil.wu.ac.th/wp-content/uploads/2019/02/ปัจจัยที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต.pdf.

มงคล ศิริจันทร์ และคณะ. 2559. "ผลของ BA และ NAA ต่อการชักนาให้เกิดยอดและรากของสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 80 ในสภาพปลอดเชื้อ." *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ.* (I) : M02/70-75, 2.

รัชนี คงคาฉุยฉาย และริญ เจริญศิริ. 2554. **โภชนาการกับผลไม้.** กรุงเทพฯ : สารคดี.

ลัดดาภรณ์ ภูแสง. ม.ป.ป. **เพอรอกซิโซม.** [Online]. Available : https://sites.google.com/site/cellstructure2/7-phe-x-ro-si-som-peroxisome.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วชร โอนพรัตนวิบูล. **Hydrogen peroxide (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์).** [Online]. Available : http://www.occmednop.com/nrhc/web/searh/chemical_attribute_show.php?UN_Number=2015&Chemical_name=Hydogen%20peroxide%20

วันทนีย์ โลหะประกิตกุล. 2559. **โพรไบโอติก จุลินทรีย์มหัศจรรย์.** [Online]. Available : http://haamor.com/th.

วราพร เหลือสินทรัพย์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์. 2555. **การวางแผนการทดลอง (Experimental Design).** กรุงเทพมหานคร : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วรวิชา ชัยพจนา. 2557. "การผลิตสารไบโอแอคทีฟชนิดผงโดยอิมัลชันเชิงซ้อน." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ศูนย์พัฒนาอนามัยพื้นที่สูง กรมอนามัย. ม.ป.ป. **เคปกูสเบอรี่ผลไม้ชาวดอย ลูกจิ๋วแต่สรรพคุณแจ๋ว.** [Online]. Available : http://hhdc.anamai.moph.go.th/ewt_dl_link.php?nid=1037.

ศุภนิมิต ทีฆชุณหเถียร. ม.ป.ป. **Inhibitors of Renin-Angiotensin System.** [Online]. Available : http://www.med.cmu.ac.th/dept/pharmaco/LearningCenter/Supanimit/02FM%20Inhibitors%20of%20RAS-3.pdf.

สีกุน นุชชา. ม.ป.ป. **อาหารเลี้ยงเชื้อ.** [Online]. Available : http://www.seekun.net/c-book-micro.htm.

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ. 2556. **ผลของข้าวกล้องงอกต่อการเจริญและการผลิตกรดของจุลินทรีย์โปรไบโอติก.** พระนครศรีอยุธยา : สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

สำนักหอสมุด มหาวิทยาแม่โจ้. ม.ป.ป. **ผลและวิจารณ์ผลการทดลองการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลของเด็กทารกและน้ำนมหมัก.** [Online]. Available : http://webpac.library.mju.ac.th:8080/mm/fulltext/thesis/2552/pongphun_boonprasom/chapter4.pdf

สุพจน์ นวลละออง. 2552. "การสกัดสารพรีไบโอติกส์จากพืชเกษตร." วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุภัจฉรา นพจินดา. 2557. "โพรไบโอติกส์กับการส่งเสริมสุขภาพ." *วารสารพยาบาลทหารบก.* 15(3) : 2, 430-435.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. 2552. "Probiotic & Prebiotic คู่หูกู้วิกฤตในระบบทางเดินอาหาร." *Technology Promotion Magazine*. 203 : 66-69.

องค์ความรู้เพื่อการพัฒนาพื้นที่สูงอย่างยั่งยืน. 2559. **เคพกูสเบอรี่.** [online]. Available : https://hkm.hrdi.or.th/knowledge/detail/98.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. **จุลชีววิทยา.** สงขลา : หจก.ภาพพิมพ์.

อัจฉรา เพิ่ม และสุภาพร เพ็งเล๊าะ. 2561. "การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก (*Lactobacillus plantarum*) ในแหนมไก่." *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 13 (2) : 168.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. "แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก." *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 23 (2) : 145-156.

อุษณีย์ ดวงพรม. 2554. "**การตั้งสมมติฐานในการวิจัย.**" ปริญญาเอกสาขาวิจัยและประเมินผลการศึกษา คณะศึกษาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

Abdallah, A.B.R. Tlili, M.S. Nefzi, A. *et al*. 2016. "Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from Nicotiana glauca organs." *Biological Control*. 6.

Allegany Nutrition. n.d. **The Human Digestive Tract pH Range Diagram.** [Online]. Available : https://www.alleganynutrition.com/supporting-pages/the-human-digestive-tract-ph-range-diagram/.

Amorim, J. Cunha, Piccolib, R. Hilsdorf, Duartea, W. Ferreira. 2018. "Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages." *Food Research International*. 107 : 519.

Bayless, T.M, Brown, E., Paige, D.M. 2017. "Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance." *Curr Gastroenterol Rep*. 19 : 4.

Bearso, S., Bearason, B., Foster, J.W. 1997. "Acid stress responses in enterobacteria." *FEMS. Microbiol. Lett*. 147 : 173-180.

Begley, M., Hill, C., Gahan, CG. 2006. "Bile salt hydrolase activity in probiotics." *Appl Environ Microbiol*. 72 : 1729-1738.

Castro, J., Ocampo, Y., Franco, L. 2015. "Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) calyces ameliorate TNBS-induced colitis in rats." *Journal of Crohn's and Colitis*. 2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Corzo, G. and Gilliland, S.E. 1999. "Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts." *J Dairy Sci.* 82 : 466-471.

Duangitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M. *et al.* 2008. "Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Plant Beverages." *Pakisatan Journal of Biological Sciences.* 11 (4) : 652-654.

ErkkilaÈ, S. and PetaÈ, E. jaÈ. 1999. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." *Meat Science.* 55 (2000) : 297-299.

Fuller, R. 1989. "Probiotic in man and animal." *J. Appl. Bacterio.* 66 : 365-378.

Gardeningchannel. 2017. **Varieties of cape Gooseberry.** [online]. Available : https://www.gardeningchannel.com/grow-cape-gooseberry/.

Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, MA. *et al.* 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea : a multicenter European trial." *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30 : 54 - 60.

Heyman M. 2000. "Effect of lactic acid bacteria on diarrhea diseases." *J Am Coll Nutr.* 19 : 137S - 146S.

Himedia. 2017. **BHI Agar (Brain Heart Infusion Agar).** Technical data M211. [Online]. Available : http://himedialabs.com/td/m211.pdf.

HiMedia Laboratories. 2015. ***Lactobacillus* MRS Agar.** Technical data M641. [Online]. Available : https://himedialabs.com/TD/M641.pdf.

Hippo, M.R. Magtoto, M.L. Tamang, M.S. *et al.* 2014. "Antioxidant Activities of Fungal Endophytes Isolated from Strawberry *Fragaria x ananassa* Fruit." *Electronic Journal of Biology.* 2.

Horti-Pride Pty Ltd. 2019. **Cape Gooseberries – A Good Source of B12.** [online]. Available : https://www.horti-pride.com.au/cape-gooseberries-a-good-source-of-b12/.

HonestDocs. 2562. **ประโยชน์ของวิตามินแต่ละชนิด กินแล้วดีอย่างไร.** [Online]. Available : https://www.honestdocs.co/each-vitamins-benefits.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huebner ES and Surawicz CM. 2006. "Treatment of recurrent Clostridium difficile diarrhea." *J Gastroen Hepatol*. 2 : 203 - 208.

Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, *et al*. 1991. "A human Lactobacillus strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children." *Pediatrics*. 88 : 90 – 97.

Karent, B. and Edison, O. 2015. "Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit." *Food Chemistry*. 3 - 4.

Knarreborg, A., Engberg, R.M., Jensen, S.K. *et al*. 2002. "Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens." *Appl Environ Microbiol*. 68 : 6425-6428.

Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, Stem U, Zunft HJF. 2003. "Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastro-intestinal symptoms in patients with chronic constipation." *Can J Gastroenterol*. 17: 655 - 659.

Lim, H.J., Kim, S.Y., Lee. W.K. 2004. "Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use." *J Vet Sci*. 5 : 391-395.

Makinen, M. and Bigret, M. 1998. **Industrial use and production pf lactic acid bacteria. In lactic acid bacteria : Microbiology and functional aspects.** Edited by salminen, S. New York : Marcel Dekker Inc. 73-102.

Mangkorn R. 2015 **Environmental Influences.** [Online]. Available : http://pirun.ku.ac.th/~fagimkr/EnvInfl.htm.

Marin, Z.T., Cortes, M., Montoya, O.I. 2010. "Frutos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) Ecotipo 'Colombia' Mínimamente Procesados, Adicionados con Microorganismos Probióticos Utilizando la Ingeniería de Matrices." *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 63(1) : 5396.

Masuda. *et al*. 1996. "Antihypertensive Peptides are Present in Aorta after Oral Administration of Sour Milk Containing These Peptides to Spontaneously Hypertensive Rats1." *J Nutr*. 126 : 3063-3068.

Match, T. 2006. "Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases." *J Physiol Pharmacol*. 57(9) : 23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Melissa Groves. 2018. **What are Golden Berries? Everything You need to Know.** [online]. Available : https://www.healthline.com/nutrition/golden-berries.

Nakamura. *et al.* 1995. "Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It that are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme." *J Dairy Sci.* 78 : 1253-1257.

Nakamura. *et al.* 1996. "Decrease of Tissue Angiotensin I-Converting Enzyme Activity upon Feeding Sour Milk in Spontaneously Hypertensive Rats." *Biosci Biotech Biochem.* 60 : 488-489

Neogen. 2010. **BRAIN-HEART INFUSION BROTH.** [Online]. Available : https://web.archive.org/web/20150204141009/http://www.neogen.com/Acum edia/pdf/ProdInfo/7116_PI.pdf.

Ogata T, Nakamura T, Anjitsu K, *et al.* 1997. "Effect of Bifidobacterium longum BB536 administration on the intestinal environment, defecation frequency and fecal characteristics of human volunteers." *Biosci Microflora.* 16: 53 - 58.

Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, *et al.* 1999. "A placebo - controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in under-nourished Peruvian children." *J Pediatr.* 134 : 15 - 20.

Parvez, S., Kim, H.Y., Lee, H.C. *et al.* 2006. "Bile salt hydrolase and cholesterol removal effect by *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976." *World J Microb Biot.* 22 : 455-459.

Rachel, W. n.d. **Microbiology Lab : MOLB 2210.** [Online]. Available : http://www.uwyo.edu/molb2210_lab/info.htm.

Ramadan, M. Fawzy. 2011. "Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of capegooseberry (*Physalis peruviana*): An overview." *Food Research International.* 44 : 1830-1831.

Reid, G. Jana, J. Sebulsky, T.M. 2003. "Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice." *Clin. Microbiol. Rev.* 16 : 660.

Reid, G. 2008. "Probiotics and prebiotics – Progress and challenges." *International Dairy Journal.* 18 : 972.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reinhold-Hurek, B., and T. Hurek. 1998. "Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. And other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function." *Critical Reviews in Plant Sciences.* 17: 29–54.

Saavedra, J., Bauman, N., Oung, I., *et al.* 1994. "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus" *Lancet.* 344 : 1046 - 1049.

Sagar Aryal. 2015. **Catalase test-principle, uses, procedure, result interpretation with precautions.** [Online]. Available : https://microbiologyinfo.com/catalase-test-principle-uses-procedure-result- interpretation-with-precautions.

Salmond, C.V., Kroll, R.G., Booth, I.R. 1984. "The effect of food preservatives on pH homoeostasis *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130 : 1845.

Sander, E.M. 2000. "Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health." *Dairy and Food Culture Technologies.* 130 : 384S – 390S.

Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D. *et al.* 2010. "Characterisation of non human origin probiotic Lactobacillus plantarum with cholesterol-lowering property." *Afr J Microbiol Res.* 4 : 994-1000.

Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. 2002. "Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea : meta - analysis." *Brit Med J.* 324 : 1 - 6.

Suskovic, J., Kos, B., Goreta, J., *et al.* 2001. "Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect." *Food technol. biotechnol.* 39 (3) : 228.

Taheri, H. R. Moravej, H. Tabandeh, F., *et al.* 2009. "Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic." *Poultry Science.* 88 : 1588.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. *et al.* 1999. "Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity." *J Dairy Sci.* 82 : 2530 - 2535.

Turpeinen, A.M., Ehlers, P.I., Kivimäki, A.S., *et al.* 2011. "Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptide-containing milk product has acute blood pressure lowering effects in mildly hypertensive subjects." *Clin Exp Hypertens.* 33(6) : 388-396.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2008. "Probiotics—From Metchnikoff to bioactives." *International Dairy Journal.* 18 : 3.

Verson, E.H. Risio, H.D. Isla, I.M. *et al.* 2017. "Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from Opuntia ficus-indica fruits that grow in Northwest Argentina." *Food Science and Technology.* 84 : 2.

Wongsariya, K. Phanthong, P. and Bunyapraphatsara, N., *et al.* 2013. "Synergistic interaction and mode of action of Citrus hystrix essential oil against bacteria causing periodontal diseases." *Informa Healthcare.* 2.

Yan, F. and Polk, B.D. 2006. "Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 9 : 717.

Yin, Q. and Zhang, Q. 2005. "Isolation and Identification of the Dominant *Lactobacillus* in Gut and Faeces of Pigs Using Carbohydrate Fermentation and 16S rDNA Analysis." *J. Bioscience. Bioeng.* 99(1) : 67-68.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI)

Calf Brain , Infusion from (solids)	7.7	กรัม
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8	กรัม
Proteose Peptone	10.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารแข็ง Brain Heart Infusion (BHI)

Calf Brain , Infusion from (solids)	7.7	กรัม
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8	กรัม
Proteose Peptone	10.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเหลว Lactobacillus MRS Broth

Proteose peptone	10.0	กรัม
HM peptone B #	10.0	กรัม
Yeast extract	5.00	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysorbate 80	1.00	กรัม
Ammonium citrate	2.00	กรัม
Sodium acetate	5.00	กรัม
Magnesium sulphate	0.10	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.00	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 6.5±0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. อาหารแข็ง Lactobacillus MRS Agar

Proteose peptone	10.0	กรัม
HM peptone B #	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอช ของอาหารเท่ากับ 6.5±0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. อาหารแข็ง Trytic Soy Agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	17.0	กรัม
Papaic Digest of Sybean	10.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Phosphate	0.3	กรัม
Agar	12.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอช ของอาหารเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA)

Peptic digest of animal tissue	5.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Beef extract	1.5	กรัม
Yeast extract	1.5	กรัม
Agar	12.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. อาหารทดสอบการใช้น้ำตาล Glucose broth (Hugh and Leifson'n O-F medium)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15.0	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอชของอาหารอยู่ประมาณ 6.8 – 7.0 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

8. อาหารทดสอบการทนกรด

เตรียมอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 3 นอร์มอล จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 2 3 4 ตามลำดับ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

9. อาหารทดสอบการทนเกลือน้ำดี

เตรียมอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่เติมเกลือน้ำดี (Bile salt) ให้มีความเข้มข้น 0.15 และ 0.3 % (w/v) ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายคริสตัลไวโอเลต

สารละลาย A ประกอบด้วย	Crystal violet	2.0	กรัม
	Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร
สารละลาย B ประกอบด้วย	Ammonium oxalate	8.0	กรัม
	น้ำกลั่น 95%	80.0	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย A โดยนำ Crystal violet มาละลายด้วย Ethyl alcohol 95% ให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 20.0 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย B โดยนำ Ammonium oxalate มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้เข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 80.0 มิลลิลิตร นำสารละลาย A และ สารละลาย B มาผสมให้เข้ากันแล้วกรองและเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายไอโอดีน (Gram's iodine solution)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลาย Iodine และ Potassium iodine ในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อยให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300.0 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายซาฟรานินโอ

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

เตรียมารละลายซาฟรานินโอเข้มข้นโดยละลาย Safranin O ใน Ethyl alcohol 95% เล็กน้อย จนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20.0 มิลลิลิตร จากนั้นกรอง เมื่อจะใช้ให้เจือจางเป็น 1:10 โดยเติมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 มิลลิลิตรและเก็บไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

นำสารโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเล็กน้อยให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. สารละลายไฮโดรคลอริค 3 นอร์มอล

ตวงกรดไฮโดรคลอริค 36% (w/v) 25.53 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเล็กน้อยให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

7. สารละลาย Bromthymol blue 0.2%

ชั่ง Bromthymol blue 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเล็กน้อยให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

8. สารละลาย 0.01 % Tween 80

ตวงสารละลาย 0.01 % Tween 80 มา 0.03 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 300 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

9. สารละลายคลอรอกซ์ 5 %

ตวงสารละลายคลอรอกซ์ 6 % (w/w) 251.59 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 300 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

10. แอลกอฮอล์ 70 %

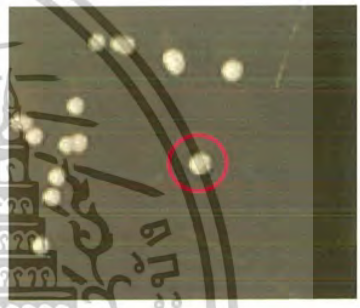
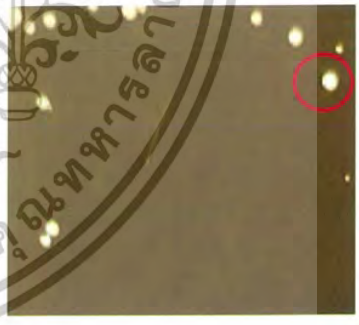
ตวงแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้าย 950 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค

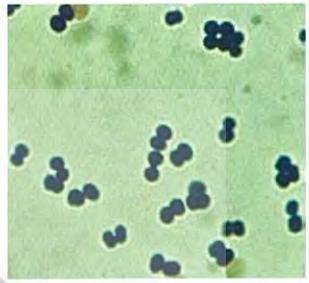
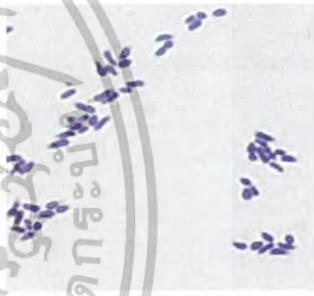
ตารางแสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทางชีวเคมี และคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงภาพลักษณะโคโลนีและการจัดเรียงตัวของเชื้อแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากเคปกูสเบอรี่

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร BHI	ภาพลักษณะโคโลนีบนอาหาร BHI
ENC1	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มันวาว โค้งนูน	
ENC2	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มันวาว โค้งนูน	
ENC3	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มันวาว โค้งนูน	

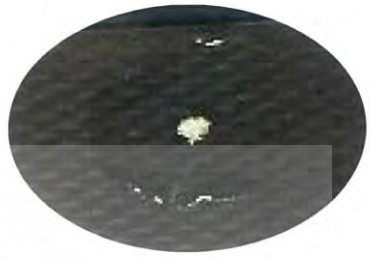
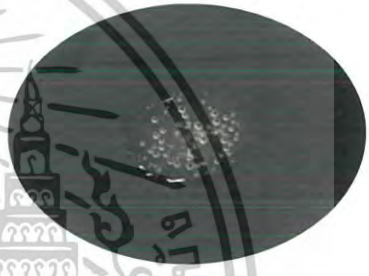
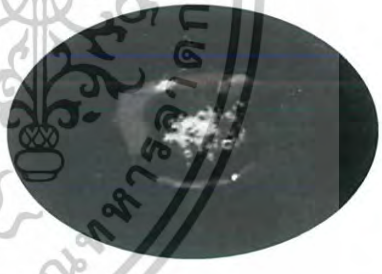
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อที่แยกได้จากเคปกูสเบอรี่

ไอโซเลทที่	แกรม	รูปร่าง	การเรียงตัว	ภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์
ENC1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	เป็นคู่สอง	
ENC2	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อนสั้น	แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอย่างอิสระ	
ENC3	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อนยาว	แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอย่างอิสระ	

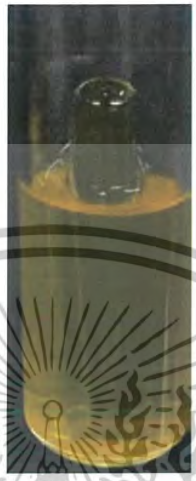
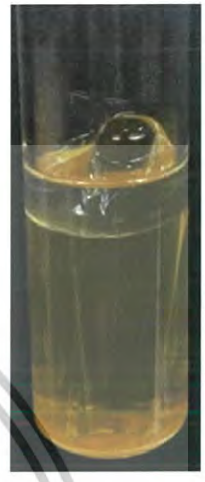
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงภาพการสร้างเอนไซม์คะตาเลสของเชื้อที่แยกได้จากเคปกูสเบอรี่

ไอโซเลทที่	การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส	
	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	ภาพแสดงผลการสร้างเอนไซม์คะตาเลส
ENC1	ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส	
ENC2	สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส	
ENC3	สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.4 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน

แบคทีเรีย	การใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน	
	สภาวะที่มีอากาศ	สภาวะที่ไม่มีมีอากาศ
Bacillus subtilis	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส
Pseudomonas aeruginosa	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ ไม่สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส	ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ ไม่สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

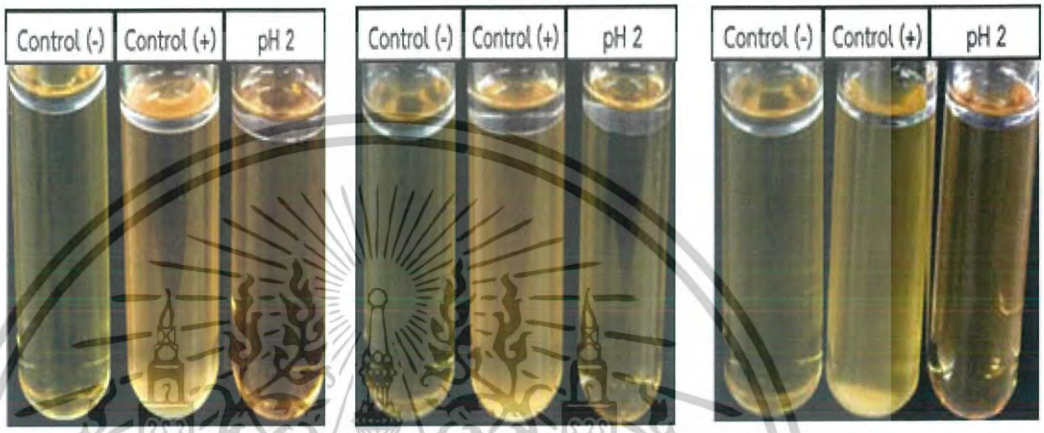
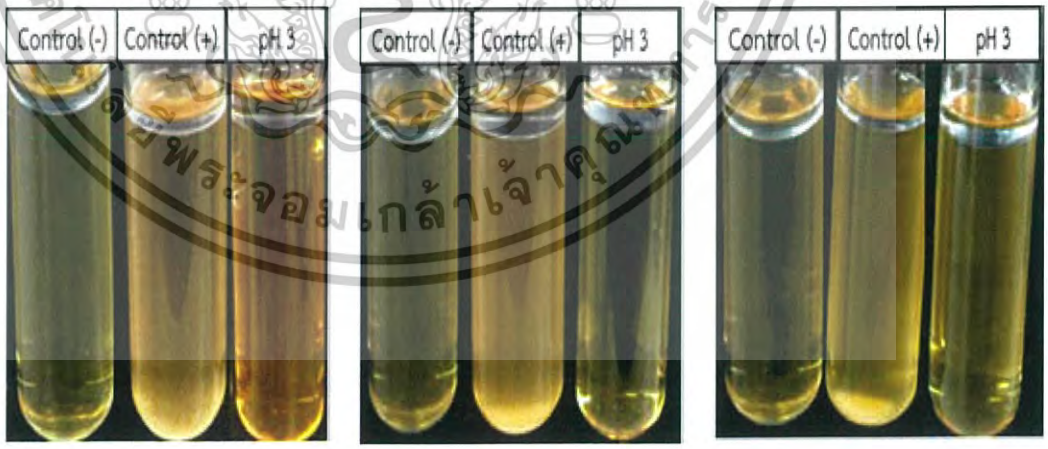
แบคทีเรีย	การใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน	
	สภาวะที่มีมีอากาศ	สภาวะที่ไม่มีมีอากาศ
Escherichia coli	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด เกิดแก๊ส	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด เกิดแก๊ส
ENC1	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย	การใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน	
	สภาวะที่มีมีอากาศ	สภาวะที่ไม่มีมีอากาศ
ENC2	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด เกิดแก๊ส	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด เกิดแก๊ส
ENC3	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส	สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรด ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.5 แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดีของเชื้อที่คัดแยกได้จากเคปกูสเบอรี่

สภาวะในการทดสอบ	ภาพแสดงผลกระทบจากการทดสอบความทนกรดในกระเพาะอาหารและความทนเกลือน้ำดีต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร BHI broth		
	ENC1	ENC2	ENC3
pH 2			
	ไม่สามารถทนกรดที่ pH 2 ได้	ไม่สามารถทนกรดที่ pH 2 ได้	สามารถทนกรดที่ pH 2 ได้
pH 3			
	ไม่สามารถทนกรดที่ pH 3 ได้	ไม่สามารถทนกรดที่ pH 3 ได้	สามารถทนกรดที่ pH 3 ได้

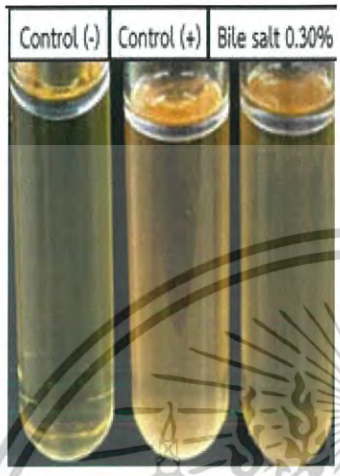
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะในการทดสอบ	ภาพแสดงผลกระทบจากการทดสอบความทนกรดในกระเพาะอาหารและความทนเกลือน้ำดีต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร BHI broth		
	ENC1	ENC2	ENC3
pH 4			
	สามารถทนกรดที่ pH 4 ได้	ไม่สามารถทนกรดที่ pH 4 ได้	สามารถทนกรดที่ pH 4 ได้
pH 8			
	สามารถทนเบสที่ pH 8 ได้	สามารถทนเบสที่ pH 8 ได้	สามารถทนเบสที่ pH 8 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะในการทดสอบ	ภาพแสดงผลกระทบจากการทดสอบความทนกรดในกระเพาะอาหารและความทนเกลือน้ำดีต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร BHI broth		
	ENC1	ENC2	ENC3
pH 9	สามารถทนเบสที่ pH 9 ได้	สามารถทนเบสที่ pH 9 ได้	สามารถทนเบสที่ pH 9 ได้
0.15% bile salt	สามารถทน 0.15% bile salt ได้	สามารถทน 0.15% bile salt ได้	สามารถทน 0.15% bile salt ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะในการทดสอบ	ภาพแสดงผลกระทบจากการทดสอบความทนกรดในกระเพาะอาหารและความทนเกลือน้ำดีต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร BHI broth		
	ENC1	ENC1	ENC1
0.30% bile salt			
	สามารถทน 0.30% bile salt ได้	สามารถทน 0.30% bile salt ได้	สามารถทน 0.30% bile salt ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงการคำนวณและวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ของผลกระทบจากการทดสอบความทนกรดในกระเพาะอาหารและความทนเกลือน้ำดีต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรีย

ตารางภาคผนวก ง.1 แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC1

One-way ANOVA

OD_{600} Measurement	Type	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 2	Between Groups	0.004	2	0.002	9.647	0.049
	Within Groups	0.001	3	0.000		
	Total	0.004	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 3	Between Groups	0.000	2	0.000	0.096	0.911
	Within Groups	0.002	3	0.001		
	Total	0.002	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 4	Between Groups	0.065	2	0.032	13.693	0.031
	Within Groups	0.007	3	0.002		
	Total	0.072	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 8	Between Groups	0.063	2	0.031	16.171	0.025
	Within Groups	0.006	3	0.002		
	Total	0.068	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 9	Between Groups	0.068	2	0.034	25.543	0.013
	Within Groups	0.004	3	0.001		
	Total	0.072	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.1 (ต่อ) แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC1

One-way ANOVA

OD_{600} Measurement	Type	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.15 %	Between Groups	0.083	2	0.041	149.444	0.001
	Within Groups	0.001	3	0.000		
	Total	0.084	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.30 %	Between Groups	0.044	2	0.022	25.791	0.013
	Within Groups	0.003	3	0.001		
	Total	0.046	5			
การเจริญของแบคทีเรีย ENC1	Between Groups	0.080	2	0.040	40.978	0.007
	Within Groups	0.003	3	0.001		
	Total	0.083	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.2 แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรมSPSS ด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่าง และความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC1

Post Hoc test

Least Significance Difference (LSD)

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 2	0	18	0.053500*	0.013934	0.031
		36	0.052500*	0.013934	0.033
	18	0	-0.053500*	0.013934	0.031
		36	-0.001000	0.013934	0.947
	36	0	-0.052500*	0.013934	0.033
		18	0.001000	0.013934	0.947
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 2	0	18	0.004500	0.026439	0.876
		36	0.011500	0.026439	0.693
	18	0	-0.004500	0.026439	0.876
		36	0.007000	0.026439	0.808
	36	0	-0.011500	0.026439	0.693
		18	-0.007000	0.026439	0.808
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 4	0	18	-0.067000	0.048712	0.263
		36	-0.246500*	0.048712	0.015
	18	0	0.067000	0.048712	0.263
		36	-0.179500*	0.048712	0.035
	36	0	0.246500*	0.048712	0.015
		18	0.179500*	0.048712	0.035
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 8	0	18	-0.104500	0.043972	0.098
		36	-0.249000*	0.043972	0.011
	18	0	0.104500	0.043972	0.098
		36	-0.144500*	0.043972	0.046
	36	0	0.249000*	0.043972	0.011
		18	0.144500*	0.043972	0.046

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.2 (ต่อ) แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรมSPSS ด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC1

Post Hoc test

Least Significance Difference (LSD)

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
OD_{600}หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 9	0	18	-0.121500*	0.036474	0.045
		36	-0.260500*	0.036474	0.006
	18	0	0.121500*	0.036474	0.045
		36	-0.139000*	0.036474	0.032
	36	0	0.260500*	0.036474	0.006
		18	0.139000*	0.036474	0.032
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.15 %	0	18	-0.121000*	0.016638	0.005
		36	-0.286500*	0.016638	0.000
	18	0	0.121000*	0.016638	0.005
		36	-0.165500*	0.016638	0.002
	36	0	0.286500*	0.016638	0.000
		18	0.165500*	0.016638	0.002
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.30 %	0	18	-0.118500*	0.029055	0.027
		36	-0.208000*	0.029055	0.006
	18	0	0.118500*	0.029055	0.027
		36	-0.089500	0.029055	0.054
	36	0	0.208000*	0.029055	0.006
		18	0.089500	0.029055	0.054
OD_{600}การเจริญของแบคทีเรีย ENC1	0	18	-0.153000*	0.031188	0.016
		36	-0.282000*	0.031188	0.003
	18	0	0.153000*	0.031188	0.016
		36	-0.129000*	0.031188	0.026
	36	0	0.282000*	0.031188	0.003
		18	0.129000*	0.031188	0.026

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.3 แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC2

One-way ANOVA

OD_{600} Measurement	Type	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 2	Between Groups	0.000	2	0.000	4.212	0.135
	Within Groups	0.000	3	0.000		
	Total	0.000	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 3	Between Groups	0.002	2	0.001	2.499	0.230
	Within Groups	0.001	3	0.000		
	Total	0.003	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 4	Between Groups	0.003	2	0.002	252.756	0.167
	Within Groups	0.000	3	0.000		
	Total	0.003	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 8	Between Groups	0.413	2	0.206	0.920	0.488
	Within Groups	0.673	3	0.224		
	Total	1.086	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 9	Between Groups	0.007	2	0.004	0.580	0.612
	Within Groups	0.018	3	0.006		
	Total	0.025	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.3 (ต่อ) แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC2

One-way ANOVA

OD_{600} Measurement	Type	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.15 %	Between Groups	0.061	2	0.031	0.693	0.566
	Within Groups	0.132	3	0.044		
	Total	0.194	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.30 %	Between Groups	0.602	2	0.301	1305.575	0.000
	Within Groups	0.001	3	0.000		
	Total	0.603	5			
การเจริญของแบคทีเรีย ENC2	Between Groups	1.424	2	0.712	68.347	0.003
	Within Groups	0.031	3	0.010		
	Total	1.456	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.4 แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรมSPSS ด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC2

Post Hoc test

Least Significance Difference (LSD)

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบ ที่ pH 2	0	18	-0.013000	0.004690	0.069
		36	-0.010000	0.004690	0.123
	18	0	0.013000	0.004690	0.069
		36	0.003000	0.004690	0.568
	36	0	0.010000	0.004690	0.123
		18	-0.003000	0.004690	0.568
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบ ที่ pH 3	0	18	-0.043500	0.020805	0128
		36	-0.007500	0.020805	0.742
	18	0	0.043500	0.020805	0.128
		36	0.036000	0.020805	0.182
	36	0	0.007500	0.020805	0.742
		18	-0.036000	0.020805	0.182
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบ ที่ pH 4	0	18	-0.053000*	0.002614	0.000
		36	-0.004500	0.002614	0.184
	18	0	0.053000*	0.002614	0.000
		36	0.048500*	0.002614	0.000
	36	0	0004500	0.002614	0.184
		18	-0.048500*	0.002614	0.000
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบ ที่ pH 8	0	18	-0.072500	0.473623	0.888
		36	-0.589000	0.473623	0.302
	18	0	0.072500	0.473623	0.888
		36	-0.516500	0.473623	0.355
	36	0	0.589000	0.473623	0.302
		18	0.516500	0.473623	0.355

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.4 (ต่อ) แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรมSPSS ด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC2

Post Hoc test

Least Significance Difference (LSD)

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
OD_{600}หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 9	0	18	0.010500	0.078040	0.901
		36	-0.067000	0.078040	0.454
	18	0	-0.010500	0.078040	0.901
		36	-0.077500	0.078040	0.394
	36	0	0.067000	0.078040	0.454
		18	0.077500	0.078040	0.394
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.15 %	0	18	-0.019000	0.210083	0.934
		36	-0.223000	0.210083	0.366
	18	0	0.019000	0.210083	0.934
		36	-0.204000	0.210083	0.403
	36	0	0.223000	0.210083	0.366
		18	0.204000	0.210083	0.403
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.30 %	0	18	-0.033000	0.015188	0.118
		36	-0.688000*	0.015188	0.000
	18	0	0.033000	0.015188	0.118
		36	-0.655000*	0.015188	0.000
	36	0	0.688000*	0.015188	0.000
		18	0.655000*	0.015188	0.000
OD_{600} การเจริญของแบคทีเรีย ENC2	0	18	-0.018000	0.102083	0.871
		36	-1.042500*	0.102083	0.002
	18	0	0.018000	0.102083	0.871
		36	-1.024500*	0.102083	0.002
	36	0	1.042500*	0.102083	0.002
		18	1.024500*	0.102083	0.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.5 แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC3

One-way ANOVA

OD_{600} Measurement	Type	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 2	Between Groups	0.017	2	0.009	8.932	0.055
	Within Groups	0.003	3	0.001		
	Total	0.020	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 3	Between Groups	0.003	2	0.002	4.544	0.124
	Within Groups	0.001	3	0.000		
	Total	0.004	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 4	Between Groups	0.063	2	0.032	3.510	0.167
	Within Groups	0.027	3	0.009		
	Total	0.090	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 8	Between Groups	0.218	2	0.109	41.025	0.007
	Within Groups	0.008	3	0.003		
	Total	0.226	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ pH 9	Between Groups	0.007	2	0.004	0.580	0.612
	Within Groups	0.018	3	0.006		
	Total	0.025	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.5 (ต่อ) แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC3

One-way ANOVA

OD_{600} Measurement	Type	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.15 %	Between Groups	0.061	2	0.031	0.693	0.566
	Within Groups	0.132	3	0.044		
	Total	0.194	5			
หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.30 %	Between Groups	0.602	2	0.301	1305.575	0.000
	Within Groups	0.001	3	0.000		
	Total	0.603	5			
การเจริญของแบคทีเรีย ENC2	Between Groups	1.424	2	0.712	68.347	0.003
	Within Groups	0.031	3	0.010		
	Total	1.456	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.6 แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรมSPSS ด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC3

Post Hoc test

Least Significance Difference (LSD)

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ pH 2	0	18	-0.112000*	0.031016	0.036
		36	-0.115000*	0.031016	0.034
	18	0	.0112000*	0.031016	0.036
		36	-0.003000	0.031016	0.929
	36	0	0.115000*	0.031016	0.034
		18	0.003000	0.031016	0.929
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ pH 3	0	18	-0.028500	0.018248	0.216
		36	-0.055000	0.018248	0.057
	18	0	0.028500	0.018248	0.216
		36	-0.026500	0.018248	0.242
	36	0	0.055000	0.018248	0.057
		18	0.026500	0.018248	0.242
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ pH 4	0	18	-0.116000	0.094819	0.309
		36	-0.251000	0.094819	0.077
	18	0	0.116000	0.094819	0.309
		36	-0.135000	0.094819	0.250
	36	0	0.251000	0.094819	0.077
		18	0.135000	0.094819	0.250
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ pH 8	0	18	-0.365000*	0.051533	0.006
		36	-0.434500*	0.051533	0.004
	18	0	0.365000*	0.051533	0.006
		36	-0.069500	0.051533	0.270
	36	0	0.434500*	0.051533	0.004
		18	0.069500	0.051533	0.270

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง.6 (ต่อ) แสดงการคำนวณและวิเคราะห์โดยโปรแกรมSPSS ด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของการทดสอบความทนกรดด่างและความทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย ENC3

Post Hoc test

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
OD_{600} หลังผ่านกาทดสอบที่ pH 9	0	18	-0.385000*	0.082997	0.019
		36	-0.382000*	0.082997	0.019
	18	0	0.385000*	0.082997	0.019
		36	0.003000	0.082997	0.973
	36	0	0.382000*	0.082997	0.019
		18	-0.003000	0.082997	0.973
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.15 %	0	18	-0.313000	0.100996	0.053
		36	-0.568500*	0.100996	0.011
	18	0	0.313000	0.100996	0.053
		36	-0.255500	0.100996	0.085
	36	0	0.568500*	0.100996	0.011
		18	0.255500	0.100996	0.085
OD_{600} หลังผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.30 %	0	18	-0.171000	0.058803	0.062
		36	-0.390000*	0.058803	0.007
	18	0	0.171000	0.058803	0.062
		36	-0.219000*	0.058803	0.034
	36	0	0.390000*	0.058803	0.007
		18	0.219000*	0.058803	0.034
OD_{600}เจริญของแบคทีเรีย ENC3	0	18	-0.486000*	0.034610	0.001
		36	-0.380000*	0.034610	0.002
	18	0	0.486000*	0.034610	0.001
		36	0.106000	0.034610	0.055
	36	0	0.380000*	0.034610	0.002
		18	-0.106000	0.034610	0.055

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้