

การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผักกาดดอง
เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่

Isolation of probiotics from pickled mustard
for development of mixed berry popping boba



ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผักกาดดอง
เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่
Isolation of probiotics from pickled mustard
for development of mixed berry popping boba

จัดทำโดย

สโรชา มะซังหลง รหัสนักศึกษา 62080143

อมรพรรณ ศิลปนรเศรษฐ์ รหัสนักศึกษา 62080156

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก



(ผศ.ดร.ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

.....27./ พฤษภาคม / 2566

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผักกาดทองเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไข่มุก ป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก	
ชื่อนักศึกษา	ศโรชา มะซังหลง	รหัสนักศึกษา 62080143
	อมรพรรณ ศิลปนรเศรษฐ์	รหัสนักศึกษา 62080156
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร	
พ.ศ.	2566	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล	

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เมื่อรับประทานเข้าไปจะก่อให้เกิด ประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักทั่วไป โดยคุณสมบัติของโพรไบโอติก นั้นไม่เพียงแต่จะมีความสามารถในการทนต่อพีเอชที่เป็นกรดหรือทนต่อเกลือแร่แต่ยังสามารถที่จะยับยั้ง แบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของ แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผักกาดทอง 2 แห่ง ได้แก่ ตลาดหนองจอก และตลาดดินแดง ซึ่งในงานวิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลทคือ NJ3, DD15, DD27 และ DD40 ซึ่งจากผลการทดสอบ พบว่าไอโซเลท DD27 มีความทนทานต่อกรดในชั่วโมงที่ 5 ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 50.46%, 57.44% และ 60.57% ที่ pH 1.5, pH 2.0 และ pH 2.5 ตามลำดับ และไอโซเลท DD40 มีความทนทาน ต่อเกลือแร่ในชั่วโมงที่ 5 ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 89.56%, 83.64% และ 79.33% ที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v), 0.6% (w/v) และ 0.9% (w/v) ตามลำดับ เมื่อศึกษาความสามารถในสร้างกรด แลคติกพบว่าไอโซเลท DD15 มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติกสูงสุด 4.33 g lactic acid/L และผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่าไอโซเลท DD15 มีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* 1070 ได้ดีที่สุด โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งได้ 1.0 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, โพรไบโอติก, อาหารหมัก,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Isolation of probiotics from pickled mustard for development of mixed berry popping boba	
Student name	Sarocho Masung-long	Student ID 62080143
	Amornpun Sillapanorased	Student ID 62080156
Program	Bachelor of Science Program in Fermentation Technology in Food Industry	
Year	2023	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Songsak Wattanachaisaereekul	

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are commonly found in fermented foods. Many of them have been exploited extensively due to their probiotic properties. Generally, probiotics can promote health benefits when consumed in adequate amount. They should also exhibit the tolerance characteristic to acidic pH and bile salts, as well as the antibacterial activity. This study aimed to evaluate the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from pickled mustard derived from Nong Jok and Din Dang markets. In this research, lactic acid bacteria can be isolated in 4 isolates: NJ3, DD15, DD27 and DD40. According to the results, DD27 isolate showed the highest survival rate in pH tolerance at 5 hours of 50.46%, 57.44% and 60.57% at pH 1.5, pH 2.0 and pH 2.5, respectively. Isolate DD40 showed the highest survival rate in bile salt tolerance at the 5 hours of 89.56%, 83.64% and 79.33% at concentrations of 0.3% (w/v), 0.6% (w/v) and 0.9% (w/v), respectively. Isolate DD15 Showed the ability to produce lactic acid up to 4.33 g lactic acid/L. In addition, the antibacterial activity test showed that the isolate DD15 had the ability to inhibit *Escherichia coli* 1070. These probiotic strains can be further used for the development of mixed berry popping boba.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotic, Fermented Food

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษเล่มนี้และตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้และคุณธรรมจาก ผศ.ดร.ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล ที่ได้ให้เกียรติเป็นที่ปรึกษาในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ทั้งยังได้ให้ความรู้และดูแลให้คำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัยและการทำเล่มปัญหาพิเศษนี้ ตลอดจนแนะนำทางการแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆให้การทำงานวิจัยนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ ผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณในความกรุณาเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณนางอัสณี วิจิตรระกะ และนางฉวี ยิ้มยนต์ รวมถึงพี่ๆนักวิทยาศาสตร์ทุกคนที่ช่วยดูแลและอำนวยความสะดวกในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ทั้งยังให้ความรู้และคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆให้การทำงานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ที่สนับสนุนและให้ความช่วยเหลือในเรื่องสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือให้ทางผู้จัดทำได้ทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จ

นอกจากนี้ผู้จัดทำขอขอบคุณครอบครัวที่ได้ให้การสนับสนุน การช่วยเหลือในเรื่องต่างๆมาโดยตลอด และให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี ตลอดจนอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

คณะผู้จัดทำปัญหาพิเศษเล่มนี้หวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และให้ความรู้เพิ่มเติมหรือสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยต่อไปแก่ผู้สนใจในงานวิจัยนี้ไม่มากนัก และหากมีเนื้อหาหรือบทความที่ผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้

สโรชา มะซังหลง

อมรพรรณ ศิลปนรเศรษฐ์

24 พฤษภาคม 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้าที่
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โพรไบโอติก (Probiotics).....	3
2.2 คุณสมบัติโพรไบโอติก.....	5
2.3 การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์อาหาร.....	7
2.4 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA....	7
2.5 กระบวนการ Spherification.....	8
2.5.1 เทคนิคสเฟิรริฟิเคชัน.....	9
2.5.2 ไข่มุกป๊อป (Popping boba)	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	11
3.1 วัสดุดิบและสารเคมี.....	11
3.2 อุปกรณ์.....	12
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....	13
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	16
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง.....	16
4.2 ผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย.....	17
4.3 ผลการทดสอบความทนต่อกรด.....	18
4.4 ผลการทดสอบความทนต่อเกลือน้ำดี.....	19
4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดแลคติก.....	21
4.6 ผลการทดสอบการต้านแบคทีเรียก่อโรค.....	22
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	23
5.1 สรุปผล.....	23
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	23
บรรณานุกรม.....	24
ภาคผนวก.....	27
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	28
ภาคผนวก ข การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง.....	29
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้.....	30

จากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ประวัติผู้เขียน..... อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแบบลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้าที
4.1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์อะตาเลส..... การย้อมสีแกรมและการจัดเรียงตัวของเซลล์	16
4.2 ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดทอง..... ด้วยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA	17
4.3 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Clear zone).....	22



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้าที่
4.1 รูปร่างท่อนของแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักกาดทองตลาดหนองจอก..... (กำลังขยาย -1,000 เท่า)	16
4.2 รูปร่างกลมของแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักกาดทองตลาดดินแดง..... (กำลังขยาย -1,000 เท่า)	17
4.3 ผลการทดสอบความทนทานต่อกรดที่ชั่วโมงที่ 0, 3 และ 5..... (ก) กรดที่ pH 1.5, (ข) กรดที่ pH 2.0, (ค) กรดที่ pH 2.5	18
4.4 ผลการทดสอบความทนทานต่อเกลือน้ำดีที่ชั่วโมงที่ 0, 3 และ 5..... (ก) ความเข้มข้นที่ 0.3%, (ข) ความเข้มข้นที่ 0.6%, (ค) ความเข้มข้นที่ 0.9% (w/v)	20
4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติก.....	21
ภาพผนวกที่	หน้าที่
ข.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดทองของตลาดหนองจอก.....	29
ข.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดทองของตลาดดินแดง.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โพรไบโอติก คือ กลุ่มแบคทีเรียหรือยีสต์ที่มีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นๆ ของร่างกายเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค ทั้งยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ได้แก่ ความสามารถในการควบคุมโรคต่างๆ รวมถึงความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น โพรไบโอติกได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความสามารถในการช่วยปรับสมดุลในระบบทางเดินโดยโพรไบโอติกที่นิยมนำมาจำหน่ายในปัจจุบันคือแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* (De Vrese & Schrezenmeir, 2008; Hill et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Prabhurajesh war & Chandrakanth, 2017).

มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในร่างกายของมนุษย์ หนึ่งในวิธีที่ปลอดภัยและเป็นประโยชน์ต่อร่างกายคือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักและจากผลการวิจัยบางงานพบว่าจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนอกจากจะมีความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี ทำให้สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารแล้ว ยังมีการสร้างแบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาต้านแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย (Gaspar et al., (2018).

ผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อป (Popping boba) มีลักษณะเป็นทรงกลมมีผิวที่บางเหมือนเจลและมีน้ำผลไม้อยู่ภายใน เมื่อกัดเม็ดไข่มุกจะแตกออกมาเป็นน้ำมีรสชาติที่หอมหวานตามรสผลไม้ ให้ความรู้สึกสดชื่นเมื่อได้รับประทาน โดยไข่มุกป๊อปเป็นขนมหวานที่เหมาะสมสำหรับการนำมาทำเป็นท็อปปิ้งได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นวัยเด็กหรือวัยทำงาน โดยสามารถรับประทานร่วมกับขนมหวาน ไอศกรีม เบเกอรี่ หรือเครื่องดื่มผลไม้ต่างๆ ทางคณะผู้จัดทำได้จึงมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อปโดยมีการเสริมจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เพื่อเป็นการเพิ่มประโยชน์ให้กับไข่มุกป๊อปโดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะช่วยรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหารและยังเพิ่มภูมิคุ้มกันในร่างกาย ทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และเป็นอีกทางเลือกให้กับผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของปัญหา

- 1.2.1 เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผักกาดทอง
- 1.2.2 เพื่อประเมินคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผักกาดทองและประเมินความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ขนมปังป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ทำให้ได้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกและมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร
- 1.3.2 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก เพื่อส่งเสริมสุขภาพโดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะช่วยรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหารและเพิ่มภูมิคุ้มกันในร่างกาย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โพรไบโอติก (Probiotics)

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization : WHO) ได้นิยามโพรไบโอติกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (FAO/WHO, 2002) โดยโพรไบโอติกที่นิยมนำมาจำหน่ายในปัจจุบันคือแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* (De Vrese & Schrezenmeir, 2008; Hill et al., 2014) เนื่องจากโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย ได้แก่ ความสามารถในการควบคุมโรคต่างๆ รวมถึงความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย (Prabhurajeshwar & Chandrakanth, 2017).

Ruttanasutja & Thongdee (2020) ได้ทำการศึกษาการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากผักดองพื้นบ้านของไทย โดยมุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักดองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ SF1, SF2, GF1 และ GF2 โดยไอโซเลท SF1 และ SF2 แยกได้จากต้นหอมดอง คือ *L. plantarum* ไอโซเลท GF1 และ GF2 แยกได้จากผักกาดเขียวปลีดอง คือ *L. fermentum* ทุกไอโซเลทสามารถยึดเกาะผนังเยื่อเซลล์ลำไส้ได้ ทั้งยังสามารถทนทานต่อสภาวะกรดที่ pH 2.5 และทนทานต่อสภาวะเกลือ น้ำดี ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) โดยทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคคือ *E. coli* และ *B. cereus* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้

Vijendra Mishra (2005) ได้ทำการศึกษาการประยุกต์ในหลอดทดลองเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ โดยจะมี *L. casei* สายพันธุ์ NCDC17, NCDC19, NCDC63, C1, C2, VT และ Y นำมาทดสอบความสามารถในการทนทานต่อกรดที่ pH 1.0, 2.0 และ 3.0 พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถทนทานต่อกรดที่ pH 3 ได้ ยกเว้นสายพันธุ์ NCDC17, C1 และ Y จะมีความสามารถในการทนทานต่อกรดที่ pH 2 และนำมาทดสอบความสามารถในการทนทานต่อเกลือ น้ำดี ที่ความเข้มข้น 1.0% และ 2.0% พบว่าสายพันธุ์ NCDC63 และ VT สามารถทนทานต่อความเข้มข้นของเกลือ น้ำดี ที่ 1.0% และ 2.0% จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยึดติดกับเซลล์เยื่อผิวของหนู พบว่าสายพันธุ์ที่มีดัชนีการยึดเกาะสูงสุดที่ 66% คือสายพันธุ์ C1 และทดสอบความไม่ชอบน้ำ พบว่าสายพันธุ์ C1 มีค่าความไม่ชอบน้ำสูงสุด ซึ่งอยู่ที่ 54.06% และสายพันธุ์ C2 มีค่าความไม่ชอบน้ำต่ำสุดอยู่ที่ 4.65% โดยรวมแล้วทุกสายพันธุ์มีความแปรผันที่แตกต่างกันทำให้มีลักษณะสำคัญในการเป็นโพรไบโอติกที่แตกต่างกันใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dunne และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาเกณฑ์การคัดเลือกในหลอดทดลองสำหรับแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มาจากนมเพื่อแยกและระบุแบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงลักษณะโพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ เช่น ความทนทานต่อน้ำดีในกรณีที่ไม่มีการแยกส่วน การต้านทานกรด การยึดเกาะกับเนื้อเยื่อเยื่อบุผิวของโฮสต์ และการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในหลอดทดลอง โดยทำการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มาจากลำไส้เล็กของมนุษย์ที่มีความเข้มข้น 0.3% ถึง 7.5% (w/v) โดยพบเชื้อ *Lactobacillus* sp. ในทุกความเข้มข้นและพบเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ในความเข้มข้นที่ 1.5% จากนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียหลายชนิด โดยมีสายพันธุ์ *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *E. coli* พบว่า *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp. ทุกสายพันธุ์สามารถต้านจุลินทรีย์ได้ แต่ไอโซเลท UCC118 ซึ่งคือ *L. salivarius* มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

Sonavale & Kunchiraman (2018) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากนมแกะและน้ำนมเหลืองควายโดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียโพรไบโอติกจากตัวอย่างอาหารคือ *Bacillus tequilensis* โดยมีไอโซเลท SHW และไอโซเลท COBT ได้ทำการศึกษาความสามารถในการทนทานต่อกรดที่ pH 3-9 พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทมีความสามารถทนทานต่อกรดที่ pH 4-9, ความสามารถในการทนทานต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% (w/v) พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทมีความสามารถทนทานต่อเกลือน้ำดีได้สูงถึง 2.0% (w/v) และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยการไตเตรท 0.1M NaOH ลงในส่วนใสของ *B. tequilensis* พบว่าไอโซเลท SHW สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 1.5042 กรัมกรดแลคติก/ลิตร และไอโซเลท COBT สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 1.3512 กรัมกรดแลคติก/ลิตร

Abouloifa และคณะ (2020) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากมะกอกดอง ในศึกษานี้มุ่งเน้นไปที่การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของ *Lactobacillus pentosus* ที่แยกได้จากมะกอกหมักในการต้านแบคทีเรีย ด้วยวิธีการนำส่วนใสของ *L. pentosus* มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่นำมาทดสอบได้ทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Escherichia coli* เนื่องจากเกิดโซนการยับยั้งมากที่สุดเท่ากับ 14.1 ± 0.14 mm การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *L. pentosus* เป็นจุลินทรีย์มีคุณสมบัติที่ดี มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์

Prabhurajeshwar & Chandrakanth (2017) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของ *Lactobacillus* sp. ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง โดยทำการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากการคัดแยก *Lactobacillus* sp. จากนั้นเปรียบเทียบพบว่าเพียง 3 ไอโซเลทไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลขที่เป็น *Lactobacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก โดยไอโซเลทที่แยกได้มีความทนทานต่อสภาวะกรดที่ pH 4 - 6.5 และทนทานต่อสภาวะเกลือแร่ที่ความเข้มข้น 0.5% - 2.0% (w/v) ทั้งยังมีความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะและมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ทั้งนี้ยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อประเมินว่าไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ฉวยโอกาสก่อโรคในร่างกายและมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์จริง

2.2 คุณสมบัติโพรไบโอติก

ในการนำจุลินทรีย์มาเป็นโพรไบโอติกนั้นจะต้องมีการศึกษาและทดสอบทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูลด้านคุณสมบัติ ประสิทธิภาพต่อสุขภาพและความปลอดภัย โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะ นำมาใช้กับคนและสัตว์นั้นมีแนวทางหลักๆ คือ สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดิน อาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้นๆได้ ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและมีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7 - 10^9 CFU/mL ของผลิตภัณฑ์) (Dunne et al., 2001)

คุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกตามหลักการใน Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food ในปี ค.ศ. 2002 มีดังนี้

(1) การตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ด้วยวิธีการที่ถูกต้อง และเป็นปัจจุบัน ทั้งทางลักษณะ (phenotype) และทางพันธุกรรม (genotype) และการเรียกชื่อ (nomenclature) ของจุลินทรีย์นั้นต้องเป็นชื่อที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและเป็นที่ยอมรับในทางวิทยาศาสตร์

(2) การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

(2.1) การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

(2.2) การทนต่อสภาวะของเกลือแร่ (bile salt resistance)

(2.3) ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเมือก หรือ เซลล์ผิวเยื่อของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ (adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell line)

(2.4) ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือแร่ (bile salt hydrolase activity)

(3) การประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์ โดยการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) หรือในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และการศึกษาในมนุษย์ เพื่อประเมินความปลอดภัย และปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

(3.1) การติดต่อสารปฏิชีวนะ

(3.2) การประเมินฤทธิ์ทางเมแทบอลิก เช่น การผลิตดี - แลกเตต (D-lactate) หรือการสลายเกลือแร่ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสาร (3.3) การประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์ กัดให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3.4) การแผ่รังสีทางระดับวิทยของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคล้างออกจำหน่ายในท้องตลาด

(3.5) การสร้างสารพิษ กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีการผลิตสารพิษ

(3.6) ฤทธิ์ทางฮีโมไลติก กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (FAO/WHO, 2002)

ซึ่งมีบัญชีรายชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารซึ่งแนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร มีดังนี้

- | | |
|---|---|
| (1) บาซิลลัส โคแอกกูแลน | (<i>Bacillus coagulans</i>) |
| (2) บีฟิโดแบคทีเรียม อะโดเลสเซนทิส | (<i>Bifidobacterium adolescentis</i>) |
| (3) บีฟิโดแบคทีเรียม อะนิมอลิส | (<i>Bifidobacterium animalis</i>) |
| (4) บีฟิโดแบคทีเรียม บีฟิเดียม | (<i>Bifidobacterium bifidum</i>) |
| (5) บีฟิโดแบคทีเรียม เบรเว | (<i>Bifidobacterium breve</i>) |
| (6) บีฟิโดแบคทีเรียม อินฟานทิส | (<i>Bifidobacterium infantis</i>) |
| (7) บีฟิโดแบคทีเรียม แล็กทิส | (<i>Bifidobacterium lactis</i>) |
| (8) บีฟิโดแบคทีเรียม ลองกัม | (<i>Bifidobacterium longum</i>) |
| (9) บีฟิโดแบคทีเรียม ซูโดลองกัม | (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>) |
| (10) เอ็นเทอโรค็อกคัส ดูแรน | (<i>Enterococcus durans</i>) |
| (11) เอ็นเทอโรค็อกคัส เฟเซียม | (<i>Enterococcus faecium</i>) |
| (12) แล็กโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส | (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) |
| (13) แล็กโทบาซิลลัส คริสปาทัส | (<i>Lactobacillus crispatus</i>) |
| (14) แล็กโทบาซิลลัส แก็สเซอร์ | (<i>Lactobacillus gasseri</i>) |
| (15) แล็กโทบาซิลลัส จอห์นสันอี | (<i>Lactobacillus johnsonii</i>) |
| (16) แล็กโทบาซิลลัส พาราเคสอี | (<i>Lactobacillus paracasei</i>) |
| (17) แล็กโทบาซิลลัส เรูเทรี | (<i>Lactobacillus reuteri</i>) |
| (18) แล็กโทบาซิลลัส รามโนซัส | (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) |
| (19) แล็กโทบาซิลลัส ซาลิวาเรียส | (<i>Lactobacillus salivarius</i>) |
| (20) แล็กโทบาซิลลัส ซีอี | (<i>Lactobacillus zeae</i>) |
| (21) แล็กโทบาซิลลัส แพนทาร์รัม 299 วี | (<i>Lactobacillus plantarum 299V</i>) |
| (22) โพรพิโอนิแบคทีเรียม อะราบินอซุม | (<i>Propionibacterium arabinosum</i>) |
| (23) สแตปฟีโลคอคคัส ไซนุรี | (<i>Staphylococcus sciuri</i>) |
| (24) แซ็กคาโรไมซีส เซรีวีซีอีส์สปีชีส์บัวลาดีอี | (<i>Saccharomyce cerevisiae</i> subsp. <i>Bouardii</i>) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2554)

(4) เกมทในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก

(4.1) ความสามารถในการเจริญได้ในภาวะความเป็นกรด - ด่างที่ค่าพีเอช (pH) ประมาณ 2, 3, 4, 8 และ 9 ซึ่งเป็นระดับความเป็นกรด - ด่างเช่นเดียวกับที่พบในกระเพาะอาหารของมนุษย์ซึ่งมีความเป็นกรดที่ค่าพีเอชเท่ากับหรือต่ำกว่า 3 และในลำไส้เล็กที่มีความเป็นด่างในระดับค่าพีเอชประมาณ 8 ถึง 9 ซึ่งมีการศึกษาพบว่าค่าพีเอชในกระเพาะอาหารอยู่ที่ประมาณ 1.5 – 2.5 (Holzapfel et al.,1998)

(4.2) ความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ซึ่งสัมพันธ์กับสภาวะการหลั่งเกลือ น้ำดีภายในลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของเกลือ น้ำดีประมาณร้อยละ 0.15 - 0.30 และเป็นแหล่งที่แบคทีเรียโพรไบโอติกอาศัยอยู่ซึ่งมีการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของเกลือ น้ำดีอยู่ที่ประมาณ 0.3% - 0.6% แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกจะต้องมีความทนทานต่อระบบทางเดินอาหารและการหลั่งเกลือ น้ำดีภายในลำไส้เล็กของมนุษย์ (Dunne et al., 2001)

2.3 การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์อาหาร

คุณสมบัตินี้ของแบคทีเรียอาจช่วยในการลดการก่อโรค โดยแบคทีเรียชนิดดังกล่าว และป้องกันปัญหาสุขภาพอื่น ๆ ที่มีแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าวเป็นสาเหตุ เมื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมะกอกดองพบว่าส่วนใส (Supernatant) ของ *L. pentosus* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ (Abouloifa, Houssam, et al. 2020) แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากไส้กรอกพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย เช่น *Listeria innocua* และ *E. coli* (Ammor et al., 2006) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากเนยแข็งและโยเกิร์ตต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *L. innocua*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* และ *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารกันบูดได้ (Yang et al., 2012)

2.4 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA เป็นการพิจารณาความเหมือนกันของ DNA (DNA-DNA homology) ที่ใช้จำแนกได้ในระดับสปีชีส์และสกุล โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของ RNA ในไรโบโซม (rRNA โดยเฉพาะในส่วนของ Well conserved region และ Less conserved region) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส ใน 16s rRNA ซึ่งการเปรียบเทียบมีความแม่นยำมากในการจัดจำแนกและใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์กันของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็นสกุลต่าง ๆ ดังนี้ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ (Stiles, 1996)

Ribosomal RNA (rRNA) ของโพรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยขนาดใหญ่ 50S (large subunit) และหน่วยขนาดเล็กขนาด 30S (small subunit) ซึ่งหน่วยเล็กประกอบด้วย 16s rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์และโปรตีน 21 ชนิด (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์, 2547) ดังนั้น RNA จึงเหมาะสำหรับนำมาศึกษาวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์ เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิดและมีหน้าที่ในการผลิตโปรตีนเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตและพบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการที่อยู่ในระดับเหมาะสมและโครงสร้างของ 16s RNA มีความสำคัญต่อเซลล์เป็นอย่างมาก ซึ่ง rRNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะแน่นอนจึงสามารถนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Janda and Abbott, 2007)

2.5 กระบวนการ Spherification

สเฟียริฟิเคชัน (spherification) เป็นเทคนิคหนึ่งของการทำอาหารแบบ molecular gastronomy ซึ่งอาศัยการรังสรรค์จานอาหารให้มีรูปแบบแปลกใหม่ ดึงดูดความสนใจ แต่ยังคงความอร่อยและรสชาติของวัตถุดิบไว้เป็นอย่างดี อาศัยหลักการทางเคมีและฟิสิกส์ในการทำให้ของเหลวจับตัวเป็นก้อนทรงกลมกึ่งแข็งอยู่ภายในและมีเยื่อบาง ๆ เป็นเจลห่อหุ้มภายนอก ทำให้อาหารที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดเจล ขนาดเล็ก รูปร่างและรสสัมผัสคล้ายไข่ปลา เทคนิคนี้ถูกค้นพบในปี 1950 ต่อมามีการนำไปใช้ในร้านอาหารและได้รับความนิยมอย่างรวดเร็ว

องค์ประกอบที่สำคัญของกระบวนการสเฟียริฟิเคชัน ได้แก่

1. อัลจิเนต (alginate) เป็นไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของอนุพันธ์ของน้ำตาล ได้แก่ กรดแมนนูโรนิก (D-mannuronic acid) กรดกลูโรนิก (guluronic acid) อัลจิเนตสกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) เช่น *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปสารประกอบของเกลือโซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียมของ กรดอัลจินิก (alginic acid) ซึ่งละลายน้ำได้สามารถทำให้เกิดเจลหรือเป็นสารกึ่งเจล (gelling) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

agent) เจลที่ได้จะทนต่อความร้อน (thermoirreversible gel) หรือไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อได้รับความร้อน อัลจินเนตเป็น unbranched binary copolymer ของ 1,4- β -D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G และ M ที่เรียกว่า G และ M-blocks ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks สัดส่วนของโคพอลิเมอร์และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจินเนต คุณสมบัติที่ดีคือทำให้เกิดเจลชนิดที่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ (irreversible gel) ในน้ำเย็น เมื่อมี Ca^{2+} รวมอยู่ด้วย ซึ่งคุณสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำนี้ทำให้อัลจินเนตแตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง

2. แคลเซียมส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ควบคู่กับโซเดียมอัลจินเนตจะได้จากธรรมชาติ เช่น นม ชีส เต้าหู้หรืออาจจะมาจากสารบางอย่างที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ เช่น แคลเซียมคลอไรด์ที่นิยมนำมาใช้แช่ผักและผลไม้ให้กรอบ ไม่เละ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (น้ำปูนใส) แคลเซียมแลคเตท แคลเซียมแลคเตททกลูโคเนต เป็นต้น

2.5.1 เทคนิคสเฟียริฟิเคชัน

2.5.1.1 เทคนิคสเฟียริฟิเคชันพื้นฐาน (basic spherification) เป็นการนำโซเดียมอัลจินเนตผสมโดยตรงกับของเหลวที่จะทำเป็นรูปทรงกลม เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม แล้วค่อย ๆ นำของเหลว เหล่านั้นหยดลงในภาชนะที่ใส่น้ำที่มีแคลเซียมคลอไรด์ละลายอยู่ เมื่อโซเดียมอัลจินเนตสัมผัสกับแคลเซียมก็จะค่อย ๆ กลายเป็นเจลจากผิวด้านนอกห่อหุ้มเข้าไป ถ้าตักขึ้นมาล้างน้ำให้แคลเซียมออกไปหมดก็จะกลายเป็นเม็ดเจลที่มีของเหลวอยู่ข้างในหรือถ้าทิ้งไว้นานกว่านั้นก็กลายเป็นเจลเม็ดกลมเหมือนไข่มุก

2.5.1.2 เทคนิคสเฟียริฟิเคชันย้อนกลับ (reverse spherification) เป็นการนำแคลเซียมผสมลงในของเหลวที่จะทำเป็นรูปทรงกลมแล้วนำไปหยดลงในภาชนะที่ใส่น้ำที่มีโซเดียมอัลจินเนตละลายอยู่ได้เป็นเจลชั้นบางๆ หุ้มอาหารที่เป็นของเหลวเอาไว้ข้างใน

2.5.2 ไข่มุกป๊อป (Popping boba)

popping boba เป็นชนิดของไข่มุกที่ใช้ในเครื่องดื่มชาไข่มุก แตกต่างจากไข่มุกแบบดั้งเดิมซึ่งเป็นแป้งมันสำปะหลัง การทำไข่มุกป๊อปทำโดยใช้กระบวนการ Reverse spherification ที่อาศัยปฏิกิริยาของโซเดียมอัลจินเนตและแคลเซียมคลอไรด์หรือแคลเซียมแลคเตท โดยสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้โซเดียมอัลจินเนตที่ไม่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิ 5°C และการใช้แคลเซียมแลคเตทที่ความเข้มข้น 0.5% -1.0% แช่ไข่มุกไว้ประมาณ 10-15 นาทีที่จะเกิดไข่มุกป๊อปที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุด (พัชรี และสุธีรา, 2018) ไข่มุกป๊อปมีลักษณะผิวบาง ๆ คล้ายเจลและมีน้ำผลไม้อยู่ข้างในที่แตกออกเมื่อป๊อป ส่วนผสมสำหรับทำไข่มุกป๊อปโดยทั่วไปประกอบด้วยน้ำ, น้ำตาล, น้ำผลไม้ต่างๆและส่วนผสมที่จำเป็นสำหรับการทำให้เป็นทรงกลม นอกจากนี้ใส่น้ำเอนกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขานมแล้วยังสามารถนำไปทำเป็นทอปปิ้งที่รับประทานคู่กับโยเกิร์ต, พุดดิ้ง, ไอศกรีมซอฟต์เสิร์ฟ หรือของหวานอื่นอีกมากมาย แต่นิยมใส่ในเครื่องดื่มผลไม้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ผักกาดดอง (Pickled mustard)

ผลไม้รวมเบอร์รี่แช่แข็ง (Frozen mixed berries)

น้ำตาลทรายขาว (Sugar)

น้ำผลไม้รวมเบอร์รี่เข้มข้น (Concentrated mixed berry juice)

3.1.2 สารเคมี

อาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

อาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

อาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)

สารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)

สารละลายกลีเซอรอล (Glycerol)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

Ox bile powder

ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein)

เมทานอล (Methyl alcohol)

คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
แคลเซียมแลคเตท (Calcium lactate)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากไม่มีเหตุที่แบบสงวนเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมอัลจีเนต (Sodium Alginate)

แซนแทนกัม (Zanthan gum)

คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol)

3.2 อุปกรณ์

จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

กระบอกตวง (Cylinder)

ขวดลูกชมพู่ (Erlenmeyer flask)

เครื่องชั่ง (Balance)

ตู้อบเชื้อ (Incubator)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

96-wells microtiter plate

เครื่อง Microplate reader

ลูปเชี่ยเชื้อ (Inoculation Loop)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

ไมโครปิเปต (Micropipette)

บีกเกอร์ (Beaker)

แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

Gel-PCR purification kit

กล่องพลาสติก (Plastic box)

หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง ทำโดยวิธีคัดแยกเชื้อ LAB ตามวิธีการของ Di Cagno et al. (2008); Ruttanasutja, & Thongdee, (2020) โดยชั่งตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง 25 g ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% (w/v) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 200 ml จากนั้นเขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 5 min ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-1} - 10^{-7} เท่า ดูดตัวอย่างสารละลายเฉพาะที่เจือจางระดับ 10^{-3} ถึง 10^{-7} ปริมาตร 1 μ l ลงในงานเพาะเลี้ยง จากนั้นเทอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เข้มข้น 0.3% (w/v) ปริมาตร 20 ml ก่อนนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 h คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีต่างกัน นำไปตรวจสอบคุณสมบัติโดยการย้อมสีแกรมและคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) โดยเลือกแบคทีเรียแกรมบวกและไม่สร้างคาตาเลส จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในอาหาร MRS broth ที่มีการเติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดลองทั้งหมด

3.3.2 Strain Identification การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย ทำโดยวิธีดังนี้ นำโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธีโคลนนิ่ง PCR ซึ่งเริ่มจากการเพาะเลี้ยง LAB ในอาหาร MRS agar เป็นเวลา 48 h จากนั้นทำการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ LAB ลงในหลอด Eppendorf โดยประกอบไปด้วย Forward Primer (7F) (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 2 μ l, Reverse Primer (1492R) (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 2 μ l, Master Mix 25 μ l (ซึ่งประกอบไปด้วย เอนไซม์ DNA polymerase, MgCl, buffer และ dNTP), น้ำ Nuclease-free 21 μ l จากนั้นเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งค่าโปรแกรมดังนี้ Initial DNA denaturation and enzyme activation 95°C 10 นาที, Denaturation 95°C 30 วินาที, Primer annealing 46°C 30 วินาที, Extension 72°C 1 นาที, Number of cycles 40 cycles Final extension 72°C 10 นาที และ อุณหภูมิที่ตัวฝา 105°C ในขณะที่รอเครื่อง PCR ให้ทำการเตรียมเจลโดยมีส่วนประกอบดังนี้ 1X TAE Buffer 100 ml ผสม Agarose 0.7 g จากนั้นทำให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงพิมพ์รองเจลแข็งตัว เมื่อ PCR ครบเวลา นำ DNA ตัวอย่างหยดบนกระดาษฟิล์ม 2 μ l ผสมกับสีย้อม Safe green 2 μ l โดย Blank คือ DNA Ladder 2 μ l ผสมกับสีย้อม Safe green 2 μ l จากนั้นหยอดลงเจลและทำการเปิดเครื่อง Gel Electrophoresis โดยตั้งค่า 110 V เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำเจลเข้าเครื่องถ่ายภาพแสง UV เพื่อดูลายพิมพ์ DNA จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sanger sequencing แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rRNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% homology) ระหว่าง ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกกับลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกในฐานข้อมูล GENBANK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการแข่งขันเพื่อชิงรางวัลเท่านั้น เมื่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

3.3.3.1 ทดสอบความทนทานต่อกรด ทำโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Melia et al. (2011) ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 ml และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 h จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ก่อนถ่ายเชื้อ 50 μ l ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 250 μ l ที่ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 1.5, 2.0 และ 2.5 (ชุดทดลอง) ส่วนชุดควบคุมใช้อาหาร MRS broth ที่มีค่า pH เท่ากับ 7 ใน 96-wells microtiter plate แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 0 h, 3 h และ 5 h ที่อุณหภูมิ 37°C โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)

$$\% \text{ survival} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}) \times 100$$

3.3.3.2 ทดสอบความทนทานต่อเกลือน้ำดี ทำโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Khochamit et al., 2015 ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 ml และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 h จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ก่อนจะนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทดสอบในอาหาร MRS broth ที่มีเกลือ Ox bile powder ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3% (w/v), 0.6% (w/v) และ 0.9% (w/v) (ชุดทดลอง) ส่วนชุดควบคุมใช้อาหาร MRS broth ที่ไม่ใส่ Ox bile powder แล้วเก็บตัวอย่างที่ 0 h, 3 h และ 5 h ซึ่งจะใช้วิธีการ Spread plate โดยถ่ายเชื้อ 100 μ l ลงบนเพลท MRS agar บ่มที่ 37°C เป็น เวลา 48 h และบันทึกจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)

$$\% \text{ survival} = (\text{จำนวนโคโลนีของชุดทดลอง} / \text{จำนวนโคโลนีของชุดควบคุม}) \times 100$$

3.3.3.3 ความสามารถในการสร้างกรดแลคติก ทำได้โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sona vale et al., 2018 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่บ่มเป็นเวลา 120 h ปริมาตร 50 ml แล้วไทเทรต 0.1M NaOH ลงในสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์เพื่อสังเกตจุดยุติที่สีชมพู (โดยกำหนดให้ 1 ml ของ 0.1M NaOH มีค่า เท่ากับกรดแลคติก 90.08 mg)

3.3.4 การทดสอบการต้านแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่บ่มเป็นเวลา 120 h ปริมาตร 50 ml นำไปทำให้เข้มข้นโดยใช้วิธี Evaporation จากนั้นเตรียมเพลท *Escherichia coli* ในอาหาร Nutrient agar ก่อนจะแปะแผ่นกระดาษที่มีสารละลายส่วนใสเข้มข้นของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 h และสังเกตการเกิดวงใส (clear zone) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 ผลิตรักข์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก

3.3.5.1 การเตรียมน้ำมิกซ์เบอร์รี่ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมวัตถุดิบที่ใช้คือผลไม้รวมเบอร์รี่แช่แข็ง 500 g นำไปปั่นให้ละเอียดแล้วมาต้มในน้ำสะอาดปริมาตร 2000 ml ใส่น้ำตาลทรายขาว 150 g และน้ำผลไม้รวมเบอร์รี่เข้มข้น 200 ml ต้มให้เดือด จนเป็นเนื้อเดียวกัน พักไว้ให้อุ่นก่อนนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางและเติม 0.4% แชนแทนกัม ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันก่อนจะเติมแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) 10^7 CFU/ml จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปทำไข่มุกป๊อป

3.3.5.2 การผลิตไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก เมื่อได้น้ำมิกซ์เบอร์รี่แล้วจะเตรียมทำการละลายโซเดียมอัลจิเนต 0.7% ในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการละลายแคลเซียมแลคเตท 5% ผสมให้เข้ากับน้ำมิกซ์เบอร์รี่ ก่อนนำไปพักไว้ในตู้เย็น 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำน้ำมิกซ์เบอร์รี่มาหยดลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมากรองและล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งจะได้เป็นผลิตรักข์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

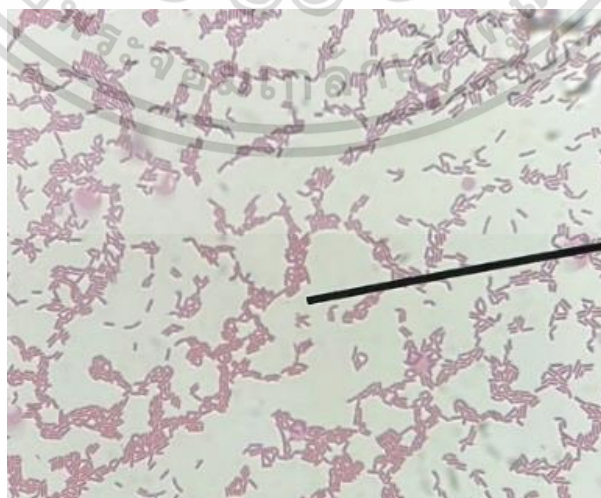
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง 2 แห่ง ได้แก่ ตลาดหนองจอก และตลาดดินแดง จะคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่เกิดวงใส (Clear zone) มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ คีตาเลส และย้อมสีแกรมแบคทีเรียเพื่อดูการติดสีและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.1

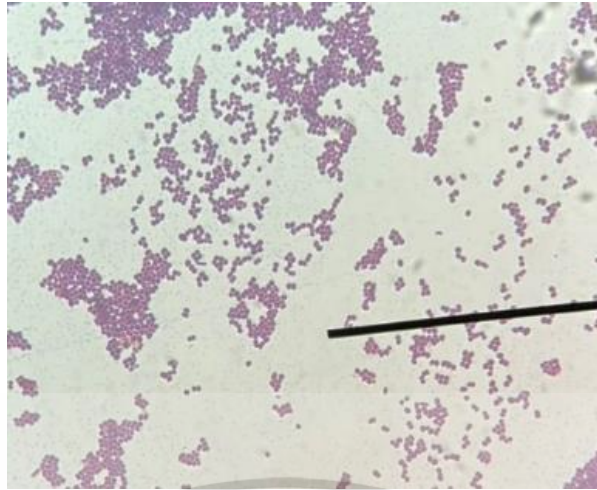
ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์คีตาเลส การย้อมสีแกรมและการจัดเรียงตัวของเซลล์

แหล่งตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง	จำนวนเชื้อ ที่คัดแยกได้ (Isolate)	ปฏิกิริยาของ เอนไซม์คีตาเลส (Catalase)	การย้อมสีแกรม (Gram stain)	รูปร่างและการจัดเรียงตัว ของเซลล์
ตลาดหนองจอก	10 isolates	-	แกรมบวก	ท่อนสั้น (Rod) มีลักษณะเกาะ กลุ่มกัน และเรียงกันเป็นสาย
ตลาดดินแดง	44 isolates	-	แกรมบวก	มีท่อนสั้น (Rod) 35 isolate กลม (Coccus) 9 isolate มีลักษณะเกาะกลุ่มกัน และ เรียงกันเป็นสาย

หมายเหตุ (-) หมายถึง ไม่เกิดปฏิกิริยา (Negative test)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับคนไข้ฉบับเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่ลงเวลาให้มาใช้ประโยชน์ด้วยการค้า
ภาพที่ 4.1 รูปร่างท่อนของแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักกาดดองตลาดหนองจอก (กำลังขยาย -1,000 เท่า)
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 รูปร่างกลมของแบคทีเรียที่คัดแยกจากผักกาดทองตลาดดินแดง (กำลังขยาย -1,000 เท่า)

4.2 ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA

จากผลการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งเป็นไปตามลักษณะของแบคทีเรียโพรไบโอติก จึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกมากที่สุดมาทั้งหมด 9 ไอโซเลทมาทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rRNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดทอง ด้วยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA

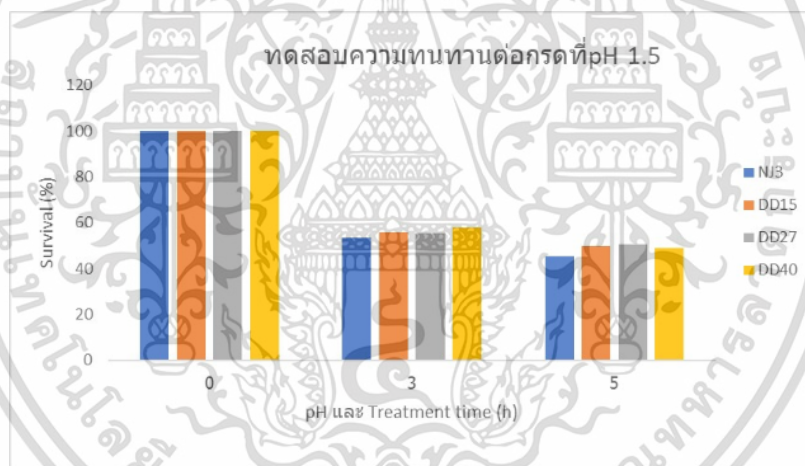
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentococcus</i>
NJ 3	DD 15-K
DD 12	DD 27-k
DD 27-L	DD 39-K
DD 42-L	DD 40-K
	DD 42-K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

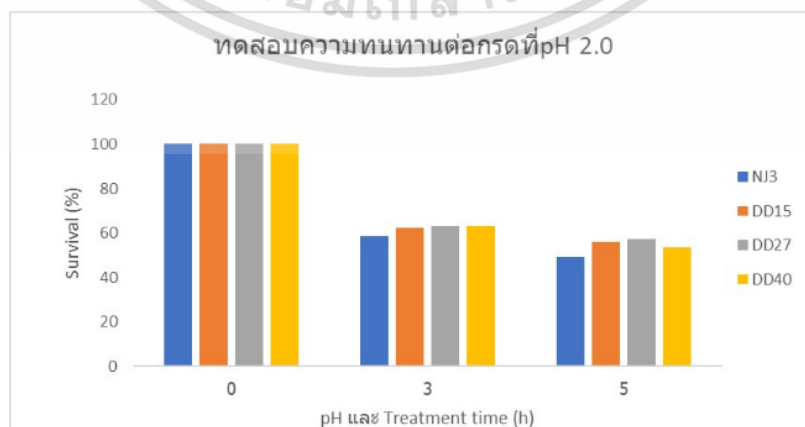
จากตารางที่ 4.2 ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เรียให้ผลออกมา 2 เชื้อคือเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* จากนั้นได้เลือกมาเชื้อละ 2 isolate เป็น 4 isolate โดยจะมี ไอโซเลท NJ3, DD27 เป็น *Lactobacillus plantarum* และไอโซเลท DD15, DD40 เป็น *Pediococcus pentosaceus* เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก

4.3 ผลการทดสอบความทนทานต่อกรด

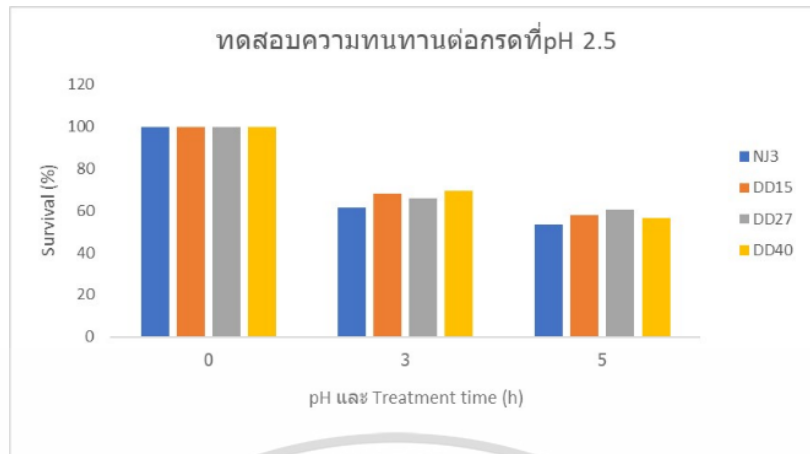
จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการคัดแยกได้จาก ผักกาดดอง โดยนำไอโซเลทที่คัดแยกได้ ได้แก่ NJ3, DD15, DD27 และ DD40 มาทดสอบความทนทานต่อ กรดที่ pH 1.5, pH 2 และ pH 2.5 วิเคราะห์ตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 3 และ 5 ดังภาพที่ 4.3



(ก)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและ (ข) ของอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)

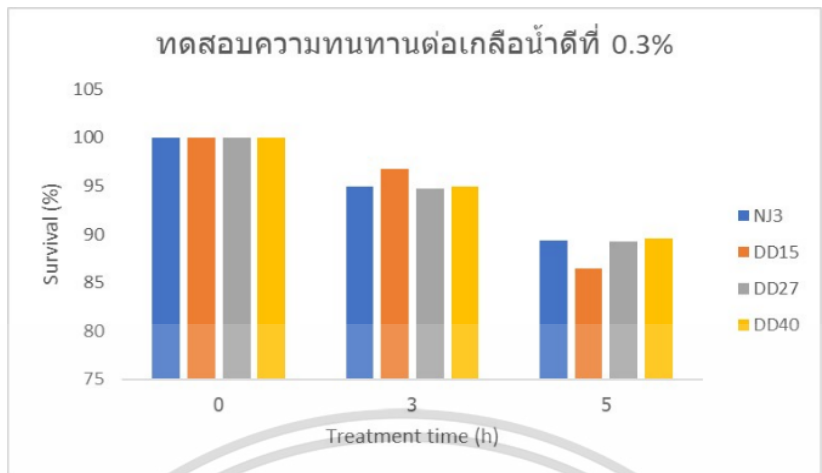
ภาพที่ 4.3 การทดสอบความทนทานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เวลา 0, 3 และ 5 ชั่วโมง; (ก) pH 1.5, (ข) pH 2.0 และ (ค) pH 2.5

จากภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบการทนทานต่อกรดที่ pH 1.5 (ก), pH 2.0 (ข) และ pH 2.5 (ค) ที่ชั่วโมงที่ 5 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบมีอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด แต่ไอโซเลทที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดคือ ไอโซเลท DD27 โดยมีอัตราการรอดชีวิตที่ pH 1.5 อยู่ที่ 50.46%, pH 2.0 อยู่ที่ 57.44% และ pH 2.5 อยู่ที่ 60.57% ซึ่งเป็นอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่า 40% จัดว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Bezkorovainy, 2001)

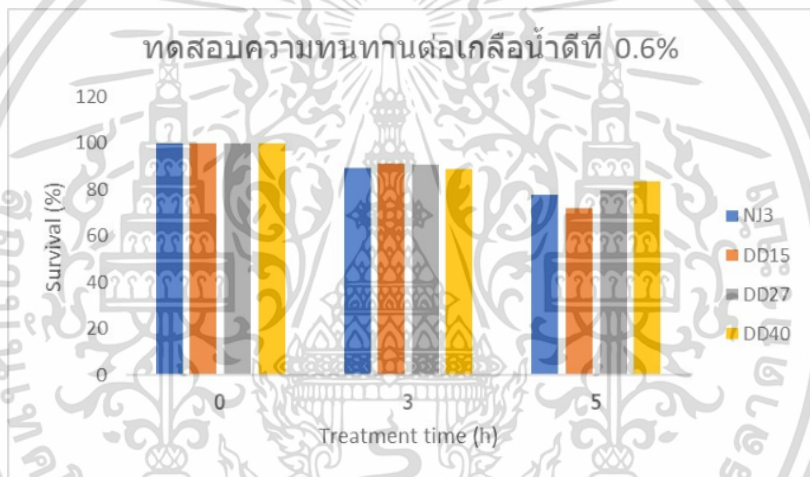
4.4 ผลการทดสอบความทนทานต่อเกลือน้ำดี

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการคัดแยกได้จากผักกาดดอง โดยนำไอโซเลทที่คัดแยกได้ ได้แก่ NJ3, DD15, DD27 และ DD40 มาทดสอบความทนทานต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v), 0.6% (w/v) และ 0.9% (w/v) วิเคราะห์ตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 3 และ 5 ดังภาพที่ 4.4

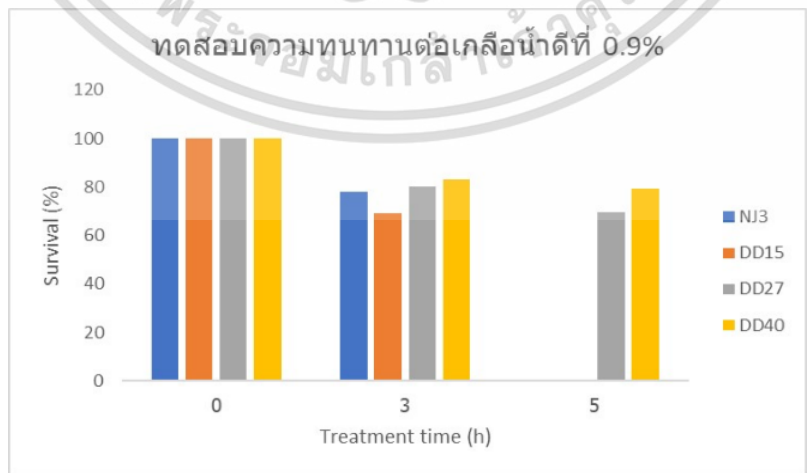
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



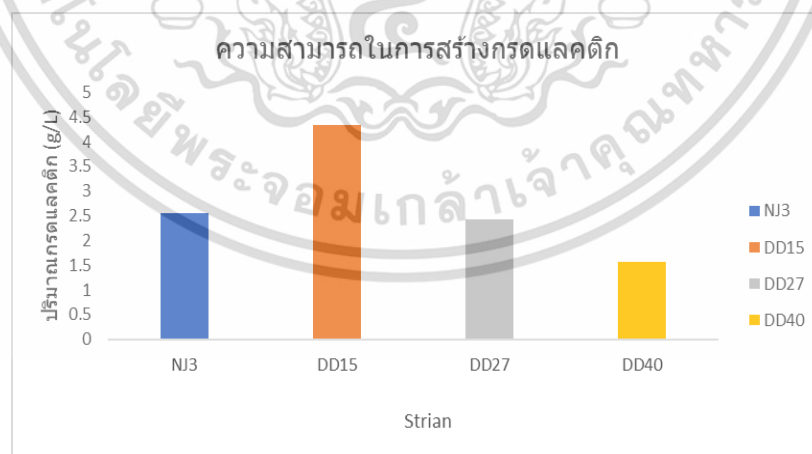
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 การทดสอบความทนทานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เวลา 0, 3 และ 5 ชั่วโมง; (ก) เกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v), (ข) เกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.6% (w/v), (ค) เกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.9% (w/v)

จากภาพที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบความทนทานต่อเกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v) (ก), ความเข้มข้น 0.6% (w/v) (ข) และความเข้มข้น 0.9% (w/v) (ค) ที่ชั่วโมงที่ 5 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบมีอัตราการรอดชีวิตยกเว้น NJ3 และ DD15 ไม่สามารถทนทานต่อเกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.9% (w/v) ที่ชั่วโมงที่ 5 ได้ แต่ไอโซเลทที่มีอัตราการรอดชีวิตในเกลื่อน้ำดีสูงที่สุดทั้ง 3 ความเข้มข้นที่ชั่วโมงที่ 5 คือ ไอโซเลท DD40 โดยมีอัตราการรอดชีวิตที่ความเข้มข้นเกลื่อน้ำดี 0.3% (w/v), 0.6% (w/v) และ 0.9% (w/v) อยู่ที่ 89.56%, 83.64% และ 79.33% ตามลำดับ รองลงมาคือไอโซเลท DD27 มีอัตราการรอดชีวิตที่ความเข้มข้นเกลื่อน้ำดี 0.3% (w/v), 0.6% (w/v) และ 0.9% (w/v) อยู่ที่ 89%, 79.52% และ 69.68% ตามลำดับ ซึ่งเป็นอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่า 40% จัดว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Bezkorovainy, 2001)

4.5 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง ได้แก่ NJ3, DD15, DD27 และ DD40



ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่นำมาทดสอบมีความสามารถที่จะผลิตกรดแลคติกได้ทั้งหมด โดยไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกมากที่สุดคือ ไอโซเลท DD15 อยู่ที่ 4.33 g Lactic acid/L รองลงมาคือ ไอโซเลท NJ3 จะอยู่ที่ 2.56 g Lactic acid/L และ ไอโซเลท DD27 ผลิตได้ 2.43 g Lactic acid/L โดยไอโซเลท DD40 สามารถผลิตได้น้อยที่สุดที่ 1.55 g Lactic acid/L

4.6 ผลการทดสอบการต้านแบคทีเรียก่อโรค

จากการศึกษาการต้าน *Escherichia coli* 1070 จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง ได้แก่ NJ3, DD15, DD27 และ DD40 โดยมี Chloramphenicol เป็นตัวควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส โดยใช้สารสกัดตามระดับความเจือจาง เพื่อด้าน *Escherichia coli* 1070

ตัวอย่างสารสกัด (10µl)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร) ที่ ระดับการเจือจางต่าง			
		ไม่เจือจาง	1/5 X	1/10 x	1/20 x
Chloramphenicol	35	3.2	2.3	2.1	1.6
NJ 3	1,088	0.5	-	-	-
DD 15	885	1	-	-	-
DD 27	1,058	0.6	-	-	-
DD 40	905	0.9	-	-	-

หมายเหตุ (-) หมายถึง ไม่เกิดวงใส (Clear zone)

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดของตัวอย่างทุกไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* 1070 ได้ในระดับที่ไม่เจือจางทั้งหมด ส่วนการเจือจางในระดับ 5 เท่า, 10 เท่า และ 20 เท่า ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยสารสกัดของเชื้อที่ทำการคัดแยกได้นั้นไม่มีความสามารถในการยับยั้งเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ที่เป็นตัวควบคุม โดยไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ DD15 ซึ่งมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 1.0 เซนติเมตร

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากผักกาดตองพบแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ทั้งหมด 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกพบว่าไอโซเลท DD27 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดในการทดสอบความทนกรด ที่ pH 2.5 อยู่ที่ 60.57% ที่เวลา 5 ชั่วโมง ในขณะที่ DD40 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดในการทดสอบความทนต่อเกลือ น้ำดี ที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v) อยู่ที่ 89.56% และ DD15 มีอัตราการผลิตกรดแลคติกมากที่สุด อยู่ที่ 4.33 g Lactic acid/L การทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรียก่อโรคพบว่า ไอโซเลท DD15 มีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* 1070 โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส อยู่ที่ 1.0 เซนติเมตร โดยไอโซเลทที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่ดีในทุกการทดสอบคือ DD27 ซึ่งจากผลการระบุสายพันธุ์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คือ *Lactobacillus plantarum* จึงได้นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่เสริมโพรไบโอติก

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาคูณสมบัติโพรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* เพียง 4 คุณสมบัติคือ ความทนทานต่อกรด, ความทนทานต่อเกลือ น้ำดี, การผลิตกรดแลคติกและความสามารถในการต้านแบคทีเรียก่อโรค ฉะนั้นจึงควรศึกษาคูณสมบัติโพรไบโอติกเพิ่มเติม ได้แก่ ทดสอบความสามารถในการเกาะกับเยื่อบุลำไส้ ทดสอบการย่อยสลายเมื่อดัดเลือดแดง และทดสอบการไวต่อยาปฏิชีวนะ

5.2.2 ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการนำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* มาใส่ในผลิตภัณฑ์ไข่มุกป๊อปมิกซ์เบอร์รี่ ฉะนั้นจึงควรศึกษาการนำไปต่อยอดผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

พัชรี คำประเวช & สุธีรา วัฒนกุล. (2018). การผลิตเม็ดปิดส่น้ำเสาวรสดด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟอริฟิเคชัน. *Thai Science and Technology Journal*, 1381-1393.

รัชฌู เมยตง & เสาวนิต ทองพิมพ์. (2019). การศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของ *Lactobacillus plantarum* BL60a ที่แยกจากอาหารหมักเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพ. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ศิริรัตน์ เฉลยสรรพ สุพรรณษา กิ่งเซ่ง, & มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. (2011). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารและแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก. *ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports*, 14(3), 10-18.

สุรัตน์ วังพิกุล & ปรียาภรณ์ อิศรานูวัฒน์. (2021). การแยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์ผักดองพื้นบ้านของ ไทย. *RMUTSB ACADEMIC JOURNAL*, 9(2), 150-163.

Adeniyi, B. A., Adetoye, A., & Ayeeni, F. A. (2015). Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *African health sciences*, 15(3), 888-895.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17(6), 454-461.

Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 399s-405s.

Bulgasem, B. Y., Hassan, Z., Abdalsadiq, N. K. A., Yusoff, W. M. W., Musa, E. M. T., & Lani, M. N. (2015). Anti-adhesion activity of lactic acid bacteria supernatant against human pathogenic *Candida* species biofilm. *Health Sciences Journal*, 9, 1-9

Dallal, M. S., Zamaniahari, S., Davoodabadi, A., Hosseini, M., & Rajabi, Z. (2017). Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables. *GMS hygiene and infection control*, 12.

De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 1–66.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., & Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 220-228.

Dunne, C and et al. “In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings”, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2): 386-392; February, 2001.

Du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., ... & Holzapfel, W. H. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International journal of food microbiology*, 40(1-2), 93-104.

Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *Amb Express*, 8, 1-8.

G.M. Evancho, W.H. Sveum, L.J. Moberg, J.F. Frank. Microbiological monitoring of the food processing environment. F.P. Downes, K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed.), American Public Health Association, Washington, DC, USA (2001), pp. 25-36

Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 253-260.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kainz, K., Bauer, M. A., Madeo, F., & Carmona-Gutierrez, D. (2020). Fungal infections in humans: the silent crisis. *Microbial Cell*, 7(6), 143.
- Kaur, A. P., Mayur, A. A., Suyash, A. K., Arti, B. K., & Kunchiraman, B. N. (2020). Probiotic Characterization of Anti-candida Bacillus. *Research Journal of Biotechnology* Vol, 15, 11.
- Melia S, Yuherman Y, Jaswandi J, Purwati E. Selection of buffalo milk lactic acid bacteria with probiotic potential, *Asian J Pharm Clin Res* 2018;11(6):186-189.
- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics. *International journal of food microbiology*, 103 (1), 109-115.
- Prabhurajeshwar, C., & Chandrakanth, R. K. (2017). Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical journal*, 40(5), 270-283.
- Przybylski, K. S., & Witter, L. D. (1979). Injury and recovery of Escherichia coli after sublethal acidification. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(2), 261-265.
- Ruttanasutja, P., & Thongdee, U. (2020). The isolation of cellulase producing bacteria from paddy field soil samples in Phra Nakhon Si Ayutthaya province. *RMUTSB Academic Journal*, 8(2), 165-175. (in Thai)
- Sonavale, R. M., & Kunchiraman, B. N. (2018). Probiotic characteristics of anti-candida *Bacillus tequilensis* isolated from sheep milk and buffalo colostrums. *Int J Heal Sci Res*, 8, 254-260.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Agar ประกอบด้วย

MRS	55.15 กรัมต่อลิตร
Agar	40.00 กรัมต่อลิตร
Calcium carbonate	10.00 กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth ประกอบด้วย

MRS	55.15 กรัมต่อลิตร
-----	-------------------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหาร Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

Nutrient	13.00 กรัมต่อลิตร
Agar	22.22 กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหาร Nutrient Broth (NB) ประกอบด้วย

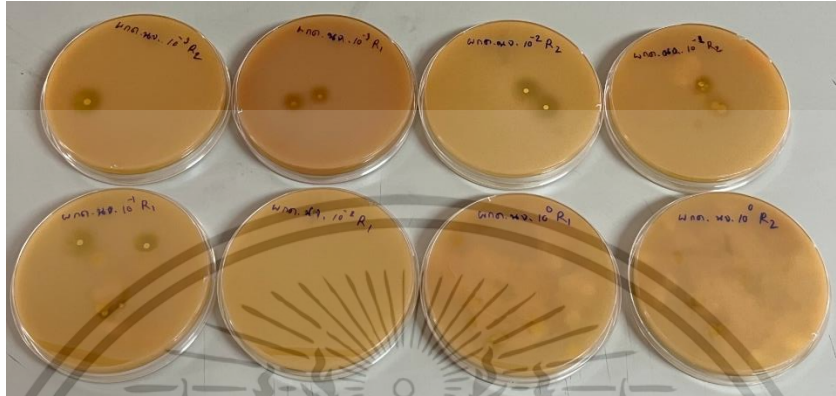
Nutrient Broth	13.00 กรัมต่อลิตร
----------------	-------------------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง



ภาพที่ ข.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดองของตลาดหนองจอก



ภาพที่ ข.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผักกาดดองของตลาดดินแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จาก

ผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท NJ 3

TGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGAT
AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCT
ATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCC
GACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTG
TTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAG
GACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG
GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAA
CGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAA
GCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATG
GATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCT
TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCG
CGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTCGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTAC

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 12

GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGC
TAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC
GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGG
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTG
AGAGTAACTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
TAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCTA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATT
ATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAG
AGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เว้นแต่การนำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 15-K

GATTATGACGTA CT TGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
 CTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTT
 TTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCA
 AGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCG
 GCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAA
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
 AGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGA
 GACTTGAGTGAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGT
 GGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCT
 GGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
 AGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAG
 GTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACC
 GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTA
 CAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCG
 CCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
 CCGCCCCTCACACC

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 27-K

GACGTA CT TGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
 AGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAA
 GATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAG
 TGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
 CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
 CGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTG
 AGTGAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAA
 GGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAAT
 CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
 GTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCC
 TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAAC
 GAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
 AGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGA
 GTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
 CGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
 GTCACACCATG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 27-L

GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGC
 TAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC
 GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT
 CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTG
 AGAGTAACCTGTTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGTGGCAAGCGTTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
 CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG
 GCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTG
 GAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA
 CTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGT
 TGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT
 TAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
 TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCT
 TAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
 GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGA

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 39-K

ACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA
 GAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAG
 ATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCAGT
 GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTA
 AAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC
 GCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGA
 GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAG
 GCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATC
 CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGG
 TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGTTCCCT
 TCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
 GGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAG
 TCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAC
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCACACCATGAG

7. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 40-K

TGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
 CAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAA
 AGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCA
 GTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
 GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCG

TAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
 GCGCAGGCGGTCTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTT
 GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAA
 TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCC
 CTTCCGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
 AAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACG
 AGTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
 ACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCATGAGAG

8. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 42-K

TGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
 CAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAA
 AGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCA
 GTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
 GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCG
 TAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
 GCGCAGGCGGTCTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTT
 GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAA
 TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCC
 CTTCCGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
 AAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACG
 AGTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
 ACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT

9. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS ของไอโซเลท DD 42-L

TGAGTGAGTGGCGAACTGGTGGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATG
 CTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCC
 CGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCG
 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAG
 TCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATATCT
 GAGAGTAACTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAA
 GCCTTCCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGA
 GGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGT
 GGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAACCTTA
 CCAGGTCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCCGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGG

TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCA
 TTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTC
 TTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
 AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGA



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาว อมรพรรณ ศิลปนรเศรษฐ์
 วัน เดือน ปีเกิด 2 ตุลาคม พ.ศ.2543
 ประวัติการศึกษา มัธยมศึกษา โรงเรียนศรีอยุธยา ในพระอุปถัมภ์ฯ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
 ปริญญาตรี คณะอุตสาหกรรมอาหาร
 สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 รางวัลที่เคยได้รับ Best innovation ideas งาน KMITL innovation expo 2023
 Popular vote งาน Project day 2023

ชื่อ-นามสกุล นางสาว สโรชา มะซึ่งหลง
 วัน เดือน ปีเกิด 5 มีนาคม พ.ศ.2543
 ประวัติการศึกษา มัธยมศึกษา โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบวิทยาลัย ปทุมธานี
 จังหวัดปทุมธานี
 ปริญญาตรี คณะอุตสาหกรรมอาหาร
 สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 รางวัลที่เคยได้รับ Best innovation ideas งาน KMITL innovation expo 2023
 Popular vote งาน Project day 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้