

การใช้สารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 เพื่อส่งเสริม  
การเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149  
UTILIZATION OF *CHLORELLA* SP. KLSc61 EXTRACT TO  
PROMOTE THE GROWTH OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*  
JCM 1149



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในห้องเรียนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UTILIZATION OF *CHLORELLA* SP. KLSc61 EXTRACT TO  
PROMOTE THE GROWTH OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*  
JCM 1149



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

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกษัตริย์และครอบครัวเท่านั้น อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การใช้สารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

Utilization of *Chlorella* sp. KLSc61 extract to promote the growth of *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

ชื่อนักศึกษา นางสาวเจตปริยา เอกอนงค์ รหัสนักศึกษา 62050578  
นายนิรันดร์ ทองทำกิจ รหัสนักศึกษา 62050614

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

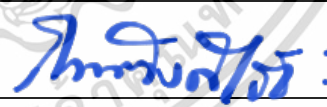


คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.กานต์ วงศาธิยะ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการ	
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การใช้สารสกัดของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของ <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149		
	Utilization of <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 extract to promote the growth of <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเจตปรียา	เอกอนงค์	รหัสนักศึกษา 62050578
	นายนิรันดร์	ทองทำกิจ	รหัสนักศึกษา 62050614
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2565		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์		

### บทคัดย่อ

ปัจจุบันสาหร่ายขนาดเล็กได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เพราะเป็นหนึ่งในทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ อีกทั้งยังเลี้ยงง่าย โตเร็ว ช่วยส่งเสริมและเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารคนและสัตว์ มีพอลิแซ็กคาไรด์และอาจจะมีสารอื่น ๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติก อาจเป็นการเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคได้ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพรีไบโอติกของ intracellular และกากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 และทำการเปรียบเทียบความเป็นพรีไบโอติกกับอินนูลิน โดยนำสารสกัด Intracellular และ กากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย มาทำการทดสอบกับโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยการเติมสารสกัด Intracellular และ กากเซลล์ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ลงไปในอาหารเลี้ยงโพรไบโอติกแบคทีเรีย จากผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัด Intracellular 2% (w/v) และกากเซลล์ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ได้ในเบื้องต้น จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมและทำการทดลองซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้

**คำสำคัญ :** คลอเรลลา, โพรไบโอติกแบคทีเรีย, Intracellular, กากเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Utilization of <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 extract to promote the growth of <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149
<b>Students</b>	Miss. Chedpreeya Aekanong Student ID 62050578 Mr. Niran Thongthamkit Student ID 62050614
<b>Degree</b>	Bachelor of Science in Industrial Microbiology Program
<b>Department</b>	Biology
<b>School</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2021
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Wipawee Dejtsakdi

### Abstract

Microalgae currently have been an interesting organism because it contains several bioactive compounds, and they are such a good food source for human health. Microalgae have several advantages due to quickly growing, easily maintaining, supplying some nutrients for human and animal health. Moreover, it consists of polysaccharides that can be used as prebiotics resource. In this study, we aimed to utilize *Chlorella* sp. KLSc61 to promote the growth of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum* JCM 1149). We first made crude extract by using distill water and separately collected cell debris from *Chlorella* crude extract. To test *L. plantarum* JCM 1149 growth, we added 2% of intracellular crude extract and cell debris into *L. plantarum* JCM 1149 media and then compared them with inulin and glucose experiment. The result showed that there was no significant different between intracellular crude extract, cell debris, glucose and inulin. We cannot yet conclude from this experiment and proposed to repeat the experiment to confirm if *Chlorella* sp. KLSc61 crude extract would inhibit *L. plantarum* JCM 1149 growth or not.

**Keywords:** *Chlorella* sp., Probiotic bacteria, Intracellular, cell debris

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง การใช้สารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ของผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องระหว่างการดำเนินงาน ด้วยความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอนเป็นอย่างดี และให้ความรู้และแนวทางในการเขียนโครงการพิเศษ รวมทั้งการตรวจแก้ไขเล่มโครงการพิเศษนี้ให้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ ที่ได้กรุณามอบเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ให้ในการศึกษาครั้งนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและให้ความรู้ในการดำเนินงาน ทำให้โครงการพิเศษนี้ออกมาสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ คณะกรรมการโครงการพิเศษ ที่ได้กรุณาอบสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ให้ เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ประจำตึกวิทยาศาสตร์อาคารเก่า ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเก็บข้อมูลและสารเคมีต่าง ๆ รวมทั้งคอยให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้ความกรุณาในการสนับสนุนและช่วยเหลือตลอดมา ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

เจตปรียา เอกอนงค์

นรินทร์ ทองทำกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 สาหร่ายสีเขียว.....	3
2.2 สาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i> sp.....	6
2.2.1 อนุกรมวิธาน.....	6
2.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา.....	7
2.2.3 แหล่งที่อยู่.....	7
2.2.4 การสืบพันธุ์.....	7
2.2.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	8
2.2.6 ระยะเวลาของการเจริญเติบโต.....	8
2.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i> sp.....	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.7.1 ปัจจัยทางกายภาพ.....	9
2.2.7.1.1 ความเข้มของแสง.....	9
2.2.7.1.2 ความยาวของคลื่นแสง.....	9
2.2.7.1.3 ช่วงระยะเวลาการได้รับแสง.....	9
2.2.7.1.4 อุณหภูมิ.....	9
2.2.7.2 ปัจจัยทางเคมี.....	9
2.2.7.2.1 แหล่งคาร์บอน.....	9
2.2.7.2.2 แหล่งไนโตรเจน.....	10
2.2.7.2.3 แหล่งฟอสฟอรัส.....	10
2.2.7.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	10
2.2.8 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้.....	10
2.3 พรีไบโอติก.....	11
2.3.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก.....	11
2.3.2 ประเภทของพรีไบโอติก.....	11
2.3.3 ประโยชน์ของพรีไบโอติก.....	14
2.4 โพรไบโอติก.....	14
2.4.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก.....	15
2.4.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก.....	15
2.5 แบคทีเรียกรดแลคติก.....	16
2.6 โพรไบโอติกแบคทีเรีย สกุล <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	17
2.6.1 อนุกรมวิธาน.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	17
2.6.3 แหล่งที่อยู่และสภาวะที่เหมาะสมของ <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	18
2.6.4 คุณสมบัติของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	18
2.6.5 คุณลักษณะของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	19
2.7 สาหร่ายที่เกี่ยวข้องกับโพรไบโอติก.....	19
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>23</b>
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	23
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	23
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
3.4 วิธีการทดลอง.....	25
3.4.1 การเตรียม TAP Medium สำหรับเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	25
3.4.1.1 สภาวะในการเลี้ยงสาหร่ายในการทดลองนี้.....	25
3.4.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญของสาหร่าย.....	26
3.4.1.3 การเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่ายและการสกัดสารจากสาหร่าย.....	26
3.4.2 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149.....	27
3.4.2.1 การเตรียม MRS medium.....	27
3.4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149.....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.2.3 การนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149.....	27
3.4.2.4 การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย, สารละลายน้ำตาลกลูโคส, สารละลายอินนูลิน, และกากเซลล์ เพื่อใช้ในการทดสอบส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149.....	28
3.4.2.5 การวัดการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149....	28
3.4.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	29
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....</b>	<b>30</b>
4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	30
4.2 ปริมาณน้ำหนักรสสกัดและกากเซลล์ที่ได้จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	31
4.3 ผลการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149 โดยการเติมสารสกัดและกากเซลล์จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	32
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>34</b>
<b>เอกสารอ้างอิง.....</b>	<b>35</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>38</b>
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	39
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย.....	42
ภาคผนวก ค สูตรการคำนวณ.....	43
ภาคผนวก ง ผลการวิจัย.....	44
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กลุ่มสาหร่ายสีเขียว.....	4
2.2 ตัวอย่างโครงสร้างของสาหร่ายสกุล <i>Chlamydomonas</i> .....	6
2.3 ลักษณะของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp .....	7
2.4 ระยะเวลาเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	8
2.5 ลักษณะโครงสร้างของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และอินนูลิน.....	12
2.6 ลักษณะโครงสร้างน้ำตาลแอลกอฮอล์.....	12
2.7 ลักษณะโครงสร้างของอินนูลิน.....	13
2.8 ภาพลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ กำลังขยายของภาค 1,000 เท่า.....	18
4.1 กราฟมาตรฐานการเจริญของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 โดยการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์โดยเฉลี่ย จากการทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ.....	31
4.2 กราฟการเจริญของ <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149 หลังจากเติมสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่าปริมาณของเซลล์สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์.....	30
4.2 ปริมาณสารสกัดและกากเซลล์แห้งจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	31



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ปัจจุบันสถานการณ์โลกที่กำลังเข้าสู่ศตวรรษแห่งผู้สูงอายุ ด้วยปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น การเพิ่มขึ้นของอายุขัย การเติบโตของสภาพประชากร และการพัฒนาการทางด้านเศรษฐกิจ ผลจากการพัฒนาทางเศรษฐกิจ ทำให้ประชาชนมีรายได้เพิ่มขึ้น มีความเป็นอยู่ที่ดี มีโภชนาการทางอาหารที่ถูกหลักอนามัย ประชากรมีมาตรฐานชีวิตที่ดี มีการศึกษา มีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีและการแพทย์ ซึ่งจะส่งผลทำให้ประชาชนมีสุขภาพที่ดีขึ้น อัตราการตายลดลง ประชากรมีอายุยืนยาวจนทำให้โลกเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ล้วนเป็นตัวเร่งให้ประชาชนหันมาตระหนักถึงการใส่ใจดูแลสุขภาพมากขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ และ อาหารฟังก์ชัน (Functional Food) ได้รับความนิยมน้อยลงแพร่หลาย Functional Food คือ อาหารที่ประกอบด้วยสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ที่ไม่ได้มีเพียงคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ยังมีส่วนช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น การลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดคอเรสเตอรอล เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน บำรุงสุขภาพร่างกาย รวมถึงการพัฒนาอาหารที่มีความเหมาะสมกับผู้บริโภคเฉพาะกลุ่ม เช่น ผู้สูงอายุ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพรีไบโอติกจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับผู้บริโภค

Prebiotics เป็นอาหารของ Probiotics โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและช่วยในการเจริญเติบโต ทำให้จุลินทรีย์ Probiotics แข็งแรงและมีปริมาณมากพอที่จะส่งผลดีต่อสุขภาพ เมื่อรับประทานเข้าไป จะไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหาร ร่างกายจะไม่สามารถดูดซึมได้ แหล่งอาหารที่เป็น Prebiotics พบได้ในน้ำนมแม่ พืช ผัก ผลไม้ ที่มีใยอาหารมาก เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส อินนูลิน เพคติน และฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ตัวอย่างอาหารที่เป็นแหล่งของ Prebiotics เช่น ผัก ได้แก่ แคนตาลูป หอมหัวแดง กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง, ข้าว แป้ง และธัญพืชไม่ขัดสี ได้แก่ ขนมปังโฮลวีท, ข้าวโอ๊ต, ข้าวบาร์เลย์, ถั่วเมล็ดแห้ง ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วเหลือง ถั่วชิกพี, ผลไม้ ได้แก่ กล้วย แอปเปิ้ล, ถั่วเปลือกแข็ง ได้แก่ เม็ดมะม่วงหิมพานต์ และพิสตาชิโอ เป็นต้น (ชฎาพร, ม.ป.ป.) และยังพบว่าสาหร่ายบางชนิด ตัวอย่างเช่น *Chlorella sp.* มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้อีกด้วย

สาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) เป็นสาหร่ายสีเขียว ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-12 ไมโครเมตร สาหร่ายคลอเรลลาถูกนำมาใช้ทางด้านอุตสาหกรรม การผลิตสารสี และสารปฏิชีวนะ การผลิตไขมันและน้ำมัน รวมทั้งการนำมาใช้ในการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม (Safi *et al.*, 2014) ซึ่งการผลิตชีวมวลจากสาหร่าย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์นั้นประกอบไปด้วยกระบวนการที่สำคัญ คือ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย การทำให้เซลล์แตก และการสกัดสารต่าง ๆ ออกจากเซลล์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยพบว่า ชีวมวลของสาหร่ายนั้นมีคุณค่าทางสารอาหารสูง อุดมไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน แคโรทีนอยด์ วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ โดยส่วนประกอบที่พบมากที่สุดคือ พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรืออนุพันธ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เส้นใยอาหาร ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติกให้กับโพรไบโอติกแบคทีเรีย และมีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกสูงมาก (โรงพยาบาลบำรุงราษฎร์, 2022)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการนำสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ มาทำการทดสอบกับโพรไบโอติกแบคทีเรีย คือ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยหวังว่าจะมีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย หากสาหร่าย *Chlorella* sp. นี้มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้ดี สามารถนำมาเป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ ก็จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน functional food และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสุขภาพอื่น ๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าและเพิ่มทางเลือกใหม่ ๆ ให้กับผู้บริโภคมากขึ้น และอาจเป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาความเป็นพรีไบโอติกของ intracellular และกากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยดูจากการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149
2. เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพรีไบโอติกระหว่าง intracellular และกากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 กับอินนูลิน โดยดูจากการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของกากเซลล์และสารสกัดที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย คือ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยเติมลงไปในการเลี้ยงโพรไบโอติกแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับการเติมสารอินนูลินและกลูโคส วัดการเจริญโดยการ drop plate ที่ 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าที่ได้มาทำการกราฟการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความเป็นพรีไบโอติกของของ intracellular และกากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยดูจากการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สามารถเปรียบเทียบความเป็นพรีไบโอติกระหว่าง intracellular และกากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 กับอินนูลิน โดยดูจากการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

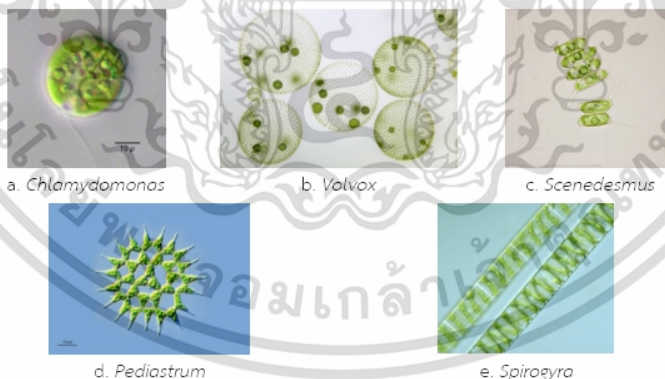
## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่าย (algae) หมายถึงสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ตรงกับภาษากรีก คือ phykos เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (microscopic algae หรือ microalgae) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ จนถึงขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic algae หรือ macroalgae) ซึ่งมีลักษณะคล้ายราก ลำต้น และใบ ซึ่งรวมเรียกว่า ทัลลัส (thallus) สาหร่ายทุกชนิดจะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง (ยูวดี, 2546)

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดอยู่ใน Division Chlorophyta เป็นสาหร่ายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีสีเขียวเหมือนหญ้า พบได้ในทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม บนดิน ต้นไม้ และสิ่งยึดเกาะต่าง ๆ สาหร่ายสีเขียวมีปริมาณมากพอ ๆ กับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว แต่จะไม่มี ความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ผิดปกติได้เช่นเดียวกับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว สาหร่ายสีเขียวบางชนิดจะมีขนาดเล็กมาก ประกอบไปด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ไปจนถึงขนาดใหญ่เป็นทัลลัส โดยรูปร่างและขนาดของสีเขียวแตกต่างกันตามชนิด บางชนิดที่ขึ้นในน้ำทะเลและมีสารพวกหินปูนมาเกาะ ทำให้มีลักษณะเป็นแผ่นแข็งสีขาว บางชนิดมีลักษณะเป็นเส้นเกาะลอยเป็นแพตามบ่อหรือตามชายฝั่งที่มีน้ำใส ซึ่งชนิดนี้ชาวบ้านแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า เทา สามารถนำมาประกอบอาหารบริโภคได้



รูปที่ 2.1 กลุ่มสาหร่ายสีเขียว

ที่มา : <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/11306-2020-02-17-06-56-12>

ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว

1. รงควัตถุ (Pigment) ของสาหร่ายสีเขียวมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไป คือมีคลอโรฟิลล์-เอ, คลอโรฟิลล์-บี, แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) จะประกอบไปด้วย แอลฟา-แคโรทีน ( $\alpha$ -Carotene), เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบตา-แคโรทีน ( $\beta$ -Carotene) และแกมมา-แคโรทีน ( $\gamma$ -Carotene) แซนโทฟิลล์ จะมีหลายชนิด โดยส่วนใหญ่ คือ ลูทีน (Lutein), ซีแซนทีน (Zeaxanthin), ไวโอลแซนทีน (Violoxanthin) และนีโอแซนทีน (Neoxanthin)

2. ผนังเซลล์ (Cell wall) โครงสร้างของผนังเซลล์จะมีลักษณะที่คล้ายกับพืชชั้นสูง โดยจะประกอบไปด้วย ซิวโมเลกุลจำพวกเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นไมโครไฟบริลประสานกันไปมาครอบคลุมเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวมีความแข็งแรงและหนา นอกจากนี้ยังอาจจะมีสารที่มีลักษณะไม่เป็นรูปเป็นร่างอีกหลาย ๆ ชนิดที่ทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์

3. คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) จะประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือเยื่อหุ้มชั้นนอก และเยื่อหุ้มชั้นใน ภายในมีของเหลวเรียกว่า สโตรมา และมีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ด้านในของคลอโรพลาสต์ ยังมีเยื่อไธลาคอยด์ ส่วนที่พับทบซ้อนไปมาเรียกว่า กรานัม และส่วนที่ไม่พับทบซ้อนกันอยู่เรียกว่า สโตรมาลาเมลลา สารสีทั้งหมดและคลอโรฟิลล์จะอยู่บนเยื่อไธลาคอยด์ มีชื่อเรียกว่า ลูเมน ซึ่งมีของเหลวอยู่ภายใน นอกจากนี้ภายในคลอโรพลาสต์ยังมี DNA RNA และไรโบโซมอยู่ด้วย ทำให้คลอโรพลาสต์สามารถจำลองตัวเองขึ้นมาใหม่และผลิตเอนไซม์ไว้ใช้ในคลอโรพลาสต์เองได้คล้ายกับไมโทคอนเดรีย

4. ไพเรโนอิด (Pyrenoid) เป็นออร์แกเนลล์ที่มักพบคู่กับคลอโรพลาสต์ มีลักษณะกลมใส ไม่มีสี สาหร่ายส่วนมากมีไพเรโนอิด ยกเว้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ไพเรโนอิดจะเป็นออร์แกเนลล์ที่มีโครงสร้างหลายชั้น โดยมีแกนกลางเป็นโปรตีน ถัดมาจะเป็นชั้นของแป้ง ส่วนชั้นนอกสุดจะเป็นแผ่นแป้งที่หุ้มเม็ดไพเรโนอิดอีกชั้นหนึ่ง เชื่อกันว่าในสาหร่ายสีเขียวไพเรโนอิดจะทำหน้าที่ในการสร้างแป้ง แต่ในสาหร่ายชนิดอื่น ๆ นั้น ไพเรโนอิดจะมีหน้าที่ในการสะสมอาหาร (รูปที่ 2.2) (ยูวดี, 2549; Lee, 2008)

5. อายสปอตหรือสติกมา (Eyespot or stigma) จะพบในเซลล์ที่เคลื่อนไหวได้ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ มีลักษณะเป็นรูปกลมรี ยาว อาจอยู่เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีสีแดง รังควัตถุในอายสปอตเป็นพวกลูเทอีน (Lutein) คริปโตแซนทีน (Cryptoxanthin) เบตา-แคโรทีน ( $\beta$ -Carotene) และ แอสตาแซนทีน (Astaxanthin) ซึ่งเป็นสารไวต่อแสง อายสปอตหรือสติกมา เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่รับแสง และมีความเชื่อมโยงกับการเคลื่อนไหวของแฟลกเจลลัม อายสปอตมีรูปร่างคล้ายถ้วยสีแดง ด้านบนมีเลนส์ปิดไว้ มักพบในตำแหน่งด้านหน้าของเซลล์ แต่สาหร่ายบางชนิดอาจจะมีอยู่ตรงกลาง หรืออยู่ส่วนท้ายของเซลล์ อายสปอตสามารถสร้างขึ้นมาใหม่ได้เอง และจะแบ่งตัวเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว (รูปที่ 2.2) (ยูวดี, 2549; Lee, 2008)

6. แฟลกเจลลัม (Flagellum) สามารถพบได้ทั้งในเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนไหวของเซลล์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจัดจำแนกสาหร่ายบางกลุ่มได้อีกด้วย โดยทั่วไปสาหร่ายส่วนมากจะมีแฟลกเจลลัมอย่างน้อยหนึ่งช่วงอายุของเซลล์ ยกเว้นสาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่พบการสร้างแฟลกเจลลัมตลอดระยะเวลาการมีชีวิต (ยูวดี, 2549; Lee, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. แวกิวโอล (Vacuole) สาหร่ายส่วนใหญ่จะมีขนาดของแวกิวโอลที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวใน Family Bryopsidophyceae จะมีเส้นแคลโลส (Callose) และเพคติน (Pectin) พาดผ่าน ส่วนสาหร่ายสีเขียวใน Order Volvocales จะมีคอนแทร็กไทล์แวกิวโอล (Contractile vacuole) ที่ทำหน้าที่ขับน้ำและของเสียออกจากเซลล์คล้ายกับพวกโปรโตซัว

8. นิวเคลียส (Nucleus) ในสาหร่ายสีเขียวจัดเป็นยูคาริโอติกแอลจี (Eukaryotic algae) โดยจะมีนิวเคลียสที่แยกออกจากไซโตพลาสซึมอย่างแท้จริง และจะมีนิวเคลียสที่มีเยื่อหุ้ม



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้างของสาหร่ายสกุล *Chlamydomonas*

ที่มา : <https://www.istockphoto.com/th>

## 2.2 สาหร่ายสกุล *Chlorella* sp.

### 2.2.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Trebouxiophyceae

Order: Chlorellales

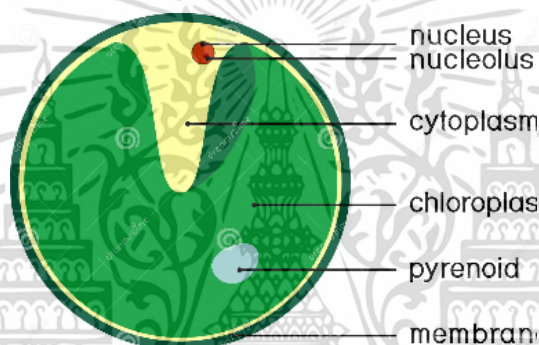
Family: Chlorellaceae

Genus: *Chlorella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว มีขนาดเล็ก ประมาณ 1-10 ไมครอน อาจจะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน ลักษณะของเซลล์จะมีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม รูปไข่ และรูปรี เซลล์มีหลายขนาดในสภาพแวดล้อมเดียวกัน สาหร่าย *Chlorella* sp. มีคลอโรพลาสต์รูปร่างคล้ายถ้วยหรือระฆัง หรือเป็นแบบแถบข้าง (parietal) อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง ไม่มีริยางค์และคอนแทร็กไทล์แวคิวโอล (contractile vacuole) (Kumar and Singh, 1971 ; Fritsch, 1975 ; Richmond, 1986) ลักษณะผนังเซลล์จะหนาและแข็ง มี 3 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นกลางจะหนาที่สุด ประกอบไปด้วย เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับโลหะหนักหรือสารพิษในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และผนังชั้นในสุดจะเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (วิสัย, 2534 ; Becker and Venkataraman, 1982)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp.

ที่มา : [https://stock.adobe.com/th/images/structure-of-chlorella-single-celled-green-algae-isolated-on-white-background/336481055?asset\\_id=336481047](https://stock.adobe.com/th/images/structure-of-chlorella-single-celled-green-algae-isolated-on-white-background/336481055?asset_id=336481047)

## 2.2.3 แหล่งที่อยู่

เซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถเติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงกว้าง ในธรรมชาติจึงพบ *Chlorella* sp. ทั้งในสภาพน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำเสีย (Kumar and Singh, 1971 ; Richmond, 1986) โดยทั่วไป *Chlorella* sp. มีทั้งที่อยู่อย่างอิสระและบางชนิดก็อาศัยอยู่ภายในตัวของสัตว์อื่น เช่น ฟองน้ำ ไฮดรา โปรโตซัว เป็นต้น (Kumar and Singh, 1971)

## 2.2.4 การสืบพันธุ์

สาหร่าย *Chlorella* sp. มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างออโตสปอร์ เพิ่มจำนวนเซลล์จาก 1 เป็น 2, 4, 8 และ 16 ออโตสปอร์ เซลล์ที่ถูกเพิ่มจำนวนจะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์แม่ เมื่อมีการเจริญขึ้นผนังของเซลล์แม่จะแตกออก ทำให้เซลล์ลูกหลุดออกมาจากเซลล์แม่ และเป็นอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

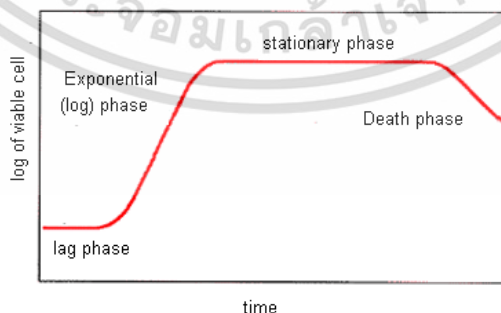
### 2.2.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. คือ อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ สำหรับการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ปริมาณมากสามารถทำได้ดังนี้ คือ ใส่หัวเชื้อสาหร่าย ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร โดยใช้อาหารสูตรของโบลด์ (Bold's Basal Medium) 900 มิลลิลิตร มีการให้อากาศตลอดเวลา จะทำให้ได้ผลผลิตสูงสุดภายใน 4-5 วัน (ลัดดา, 2543)

### 2.2.6 ระยะของการเจริญเติบโต (ธวัชชัย, 2547)

เมื่อนำเซลล์สาหร่ายใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว แล้วจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่า เซลล์สาหร่ายจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะเป็นไป ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่ายเริ่มพบและปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม มีการสร้างโปรตีนและส่วนประกอบอื่น ๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนท้าย ๆ ของระยะนี้ เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย และพร้อมที่จะแบ่งตัว
2. Exponential หรือ Log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และกระบวนการต่าง ๆ ตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน
3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ อัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง และของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตอีกด้วย
4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายเพิ่มมากขึ้น อาจเกิดจากอาหารหมด และมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก



รูปที่ 2.4 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ที่มา : <https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time>  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นาไปเซประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp.

### 2.2.7.1 ปัจจัยทางกายภาพ

#### 2.2.7.1.1 ความเข้มของแสง

ปริมาณความเข้มของแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยความเข้มแสงที่ไม่เพียงพอ จะทำให้สาหร่ายสูญเสีย biomass และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายจะช้า เพราะสาหร่ายจะใช้คาร์โบไฮเดรต และออกซิเจนในช่วง photorespiration แต่ถ้าปริมาณแสงมากเกินไป จะส่งผลให้สาหร่ายตาย และเกิดการฟอกขาว (Jeong *et al.*, 2013)

#### 2.2.7.1.2 ความยาวของคลื่นแสง

สาหร่ายส่วนใหญ่จะดูดซับแสงที่มีความยาวคลื่น 400-700 nm โดยสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีการดูดซับที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวมี chlorophylls ซึ่งเป็นเม็ดสีที่สำคัญในการดูดซับพลังงานแสง ในช่วงความยาวคลื่น 450-475 nm และ 630-675 nm และมี carotenoids ซึ่งเป็นสีเสริมดูดซับพลังงานแสง ในช่วง 400-550 nm (Masojídex *et al.*, 2003) ช่วงความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. vulgaris* อยู่ในช่วงแสงสีฟ้า (420-450 nm) และแสงสีแดง (660-700 nm)

#### 2.2.7.1.3 ช่วงระยะเวลาการได้รับแสง

ช่วงเวลากการได้รับแสงในแต่ละวันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันภายในเซลล์ (Khoeyi *et al.*, 2012) การให้แสงช่วงเวลาหนึ่งแล้วหยุดการให้แสง จะให้ผลดีกว่าการให้แสงตลอดเวลา ช่วงแสงที่นิยมใช้ คือ 12 ชั่วโมงสว่าง: 12 ชั่วโมงมืด, 14 ชั่วโมงสว่าง: 10 ชั่วโมงมืด และ 16 ชั่วโมงสว่าง: 8 ชั่วโมงมืด (ลัดดา, 2543)

#### 2.2.7.1.4 อุณหภูมิ

สาหร่ายไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิภายในเซลล์ได้ อุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญด้านสิ่งแวดล้อมที่สามารถกำหนดกิจกรรมต่าง ๆ ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสาหร่ายจะอยู่ระหว่าง 20-24 องศาเซลเซียส และจะทนต่ออุณหภูมิในช่วง 16-27 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ช้า และจะตายที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสขึ้นไป (Lavens and Sorgeloos, 1996)

### 2.2.7.2 ปัจจัยทางเคมี

#### 2.2.7.2.1 แหล่งคาร์บอน

สาหร่ายสามารถจับก๊าซ CO<sub>2</sub> จากแหล่งต่าง ๆ เช่น จากอากาศ โรงงาน และที่อยู่ในรูปคาร์บอนเนตที่สามารถละลายน้ำได้ โดยสาหร่ายจะได้รับ CO<sub>2</sub> จากการเติมอากาศ หรือสัมผัสกับอากาศโดยตรง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แต่เนื่องจากปริมาณ CO<sub>2</sub> ในอากาศ มีแค่เพียง 0.033% (Chelf *et al.*, 1993) ทำให้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายจำเป็นต้องใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่น ๆ ที่สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ เช่น glucose, acetate, ethanol และ fructose เป็นต้น (ลัดดา, 2543)

#### 2.2.7.2.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ หากปริมาณไนโตรเจนมีจำกัด สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนจากแหล่งต่าง ๆ เช่น Ammonia, nitrate, nitrite และ urea ในการเจริญเติบโตได้ (Li *et al.*, 2008)

#### 2.2.7.2.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่สาหร่ายทุกชนิดจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโต และมีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ปกติเซลล์จะใช้ฟอสฟอรัสได้ดีในรูป orthophosphate ซึ่งจะพบได้ตามธรรมชาติ และสาหร่ายยังสามารถใช้ฟอสฟอรัสในรูปของอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ เช่น  $H_2PO_4^-$  หรือ  $HPO_4^{2-}$  ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย

#### 2.2.7.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่า pH ของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงมีผลกระทบต่อกระบวนการเผาผลาญอาหาร และการเจริญเติบโตของสาหร่าย รวมถึงการเปลี่ยนแปลงสภาพสมดุลของสารอนินทรีย์ คาร์บอน สาหร่ายส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตและสังเคราะห์แสงได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง คือ pH 7-9 (Dorling *et al.*, 1997; Lavens and Sorgeloos, 1996)

### 2.2.8 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้

1. อาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella* sp. มีสารอาหารที่ครบถ้วน และดีต่อสุขภาพ สามารถผลิตโปรตีนได้สูง ในปัจจุบันจึงได้มีการผลิตออกมาขายเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผง เม็ด แคปซูล เป็นต้น

2. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สาหร่ายเป็นผู้ผลิตที่สำคัญของห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำ ซึ่งเป็นอาหารของปลา กุ้ง หอย ที่อยู่ในช่วงวัยอ่อน สาหร่าย *Chlorella* sp. จึงเป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนเช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการค้า ก็จะมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นอาหารสัตว์ด้วย (อัจฉราภรณ์, 2544)

3. ใช้ในทางการแพทย์และผลิตยาปฏิชีวนะ โดยสาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถผลิตสารบางอย่างออกมายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ อีกทั้งสาหร่าย *Chlorella* sp. ยังสามารถผลิตยาปฏิชีวนะ Chlorellin ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย สามารถทำให้น้ำเสียมีคุณภาพที่ดีขึ้น เนื่องจากสารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสียได้ถูกนำไปใช้ในการเจริญของสาหร่าย เช่น ไนโตรเจนและฟอสเฟต และสาหร่ายจะปล่อยออกซิเจนออกมา ทำให้น้ำมีคุณภาพที่ดีขึ้น (ศิริภรณ์ และฐปน, 2553)

5. การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เนื่องจาก สาหร่าย *Chlorella* sp. มีไขมันและน้ำมันเป็นองค์ประกอบอยู่ในเซลล์ประมาณร้อยละ 28-32 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Chisti, 2007) จึงทำให้สามารถสกัดไขมันและน้ำมันออกมาได้

## 2.3 พรีไบโอติก (Prebiotic)

พรีไบโอติก เป็นสารประกอบกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน สามารถผ่านไปสู่บริเวณลำไส้ใหญ่ได้ในสภาพที่สมบูรณ์ มีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกในลำไส้ใหญ่และส่งเสริมสุขภาพของ Host ซึ่งจะช่วยลดและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Gibson and Roberfroid, 1995)

### 2.3.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

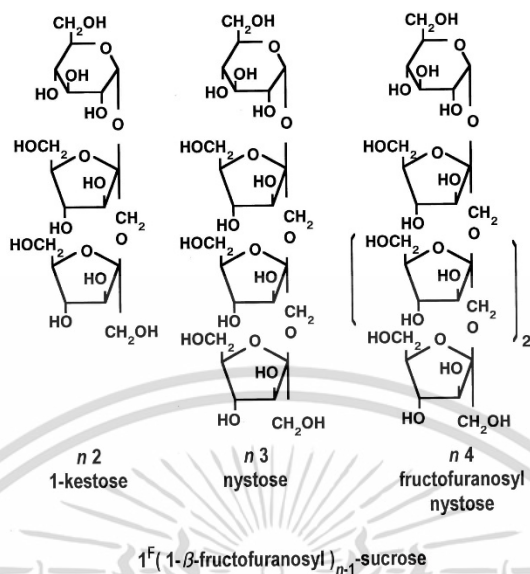
สารที่จะเป็นพรีไบโอติกได้นั้น ต้องเป็นสารที่สามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหารได้ และสามารถเคลื่อนที่ไปจนถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังต้องไปส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร และไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (Gibson and Roberfroid, 1995)

### 2.3.2 ประเภทของพรีไบโอติก

#### 1. น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Sugar and Oligosaccharides)

เป็นพรีไบโอติกกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด จัดอยู่ในพวก short-chain oligosaccharides ที่เป็น non-digestible oligosaccharides (NDO) ประกอบไปด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย เช่น Fructo-Oligosaccharides (FOS) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

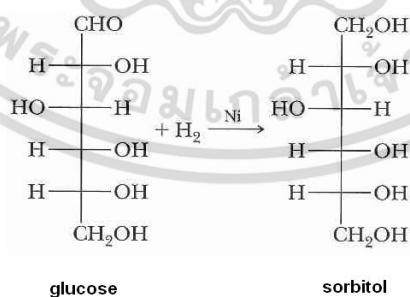


รูปที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และอินนูลิน

ที่มา : <https://www.ibioworld.com/Ingredients0000000067>

## 2. น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Alcohol sugar)

เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีค่าดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์เพียง 1-2 ตัว ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ maltitol, sorbitol, isomalt และ xylitol เป็นต้น นิยมใช้เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์ประเภท diet food เนื่องจากเป็นสารให้ความหวานที่มีระดับให้ความหวานเป็นครึ่งหนึ่งของน้ำตาลซูโครส



รูปที่ 2.6 ลักษณะโครงสร้างน้ำตาลแอลกอฮอล์

ที่มา : <https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1628/sugar-alcohol>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. Resistant starch

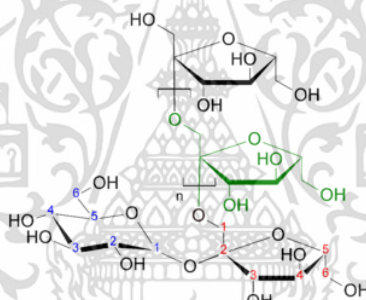
เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ถูกย่อย และถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร เนื่องจากเป็นแป้งที่มีองค์ประกอบของอะมิโนเพกติน มากกว่าร้อยละ 20-25

### 4. non-starch polysaccharides (NSPs)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้รับจากพืช เช่น เพ็กติน, เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และไซแลน

### 5. อินนูลิน (Inulin)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตให้กับพืช พบในพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม หัวกระเทียม เป็นต้น โครงสร้างของอินนูลินจะประกอบไปด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ คือ กลูโคส (Glucose) และพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta(2-1)$  ที่มีความยาวตั้งแต่ 2-60 หน่วย โดยทั่วไปอินนูลินจะมีขนาดโครงสร้างหรือค่าดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ประมาณ 10 ส่วน Fructo-Oligosaccharides โดยทั่วไปจะประมาณ 4 (Gibson *et al.*, 1995)



รูปที่ 2.7 ลักษณะโครงสร้างของอินนูลิน

ที่มา : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inulin\\_strukturformel.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inulin_strukturformel.png)

### 6. Related mucopolysaccharides

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้างของสัตว์ไม่มีการแตกกิ่งก้าน ประกอบด้วยสายของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลอะมิโนพวกเฮกโซซามีน และกรดยูโรนิก และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการหมักในลำไส้

### 7. โปรตีนและเพปไทด์ (Proteins and peptides)

พรีไบโอติกกลุ่มนี้ได้จากสารอาหารกลุ่มโปรตีน สร้างโดยการหลังของตับอ่อน แต่พบได้น้อยกว่าพรีไบโอติกในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.3 ประโยชน์ของพรีไบโอติก

#### 1. ผลต่อระบบทางเดินอาหาร

พรีไบโอติกจะเป็นอาหารให้กับแบคทีเรียในลำไส้ เมื่อแบคทีเรียนำไปใช้ จะให้พลังงานและสารสำคัญบางอย่าง เช่น Inulin-type fructans จะให้กรดแลคติก (Lactic acid) และกรดไขมันชนิดสายสั้น (short-chain fatty acids) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการหมัก โดยการหมักนี้จะไปกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacteria* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ดีต่อสุขภาพ และจะเกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ในลำไส้ ทำให้ป้องกันอาการท้องเสีย ที่เกิดจากการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ ด้วยคุณสมบัติคล้ายใยอาหาร ยังสามารถช่วยบรรเทาอาการท้องผูกได้อีกด้วย ทำให้สามารถขับถ่ายได้ง่ายขึ้น

#### 2. ผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด

ในปี ค.ศ. 2001 Scholz-Ahrens และคณะ ได้รายงานว่าผลกระทบจากกระบวนการหมักพรีไบโอติก ทำให้ค่า pH ทางเดินอาหารลดลง ช่วยเพิ่มการดูดซึมของสารอาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และเหล็ก เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคกระดูกพรุน

#### 3. การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

คอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลีโกลิไซด์ เนื่องจากพรีไบโอติกสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยกลีโกลิไซด์ได้ ทำให้กลีโกลิไซด์ถูกย่อยเป็นกลีโกลิไซด์อิสระ และถูกขับออกทางอุจจาระ ทำให้ร่างกายต้องใช้คอเลสเตอรอลมาสังเคราะห์เป็นกลีโกลิไซด์ทดแทน

#### 4. การป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

พรีไบโอติกสามารถลดภาวะเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ ในปี ค.ศ. 2006 Gibson และ Rastall ได้อธิบายไว้ว่า butyrate ที่เกิดจากกระบวนการหมักจะไปกระตุ้นให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต หยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และช่วยเพิ่มการตายตามธรรมชาติของเซลล์ได้ ซึ่งคุณสมบัติทั้ง 3 ประการนี้ อาจมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้

## 2.4 โพรไบโอติก (Probiotic)

โพรไบโอติก หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ และสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อกลีโกลิไซด์ในลำไส้ได้ รวมถึงจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร โดยในอาหารโพรไบโอติกจะมีจุลินทรีย์เพียงหนึ่งชนิดหรือมากกว่าก็ได้ โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้รับการศึกษาและตรวจสอบอย่างแน่ชัดแล้วว่าไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น โดยจะมีส่วนช่วยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการควบคุมและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ส่วนใหญ่มนุษย์จะรับจุลินทรีย์กลุ่มนี้เข้าไปจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักต่าง ๆ เป็นต้น อีกทั้งจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะทำหน้าที่ย่อยอาหารและสามารถผลิตสารอาหารที่ดีและมีประโยชน์ได้ เช่น กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (ธารารัตน์, 2542)

#### 2.4.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

1. จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องสามารถทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ดี เนื่องจากค่า pH ในกระเพาะอาหารค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องสามารถทนต่อค่า pH ในช่วงนี้ได้ จึงจะสามารถมีชีวิตรอดผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้ (Kontula *et al.*, 1998)

2. จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องสามารถทนต่อเกลือแร่ได้ เนื่องจากบริเวณลำไส้เล็กจะมีน้ำดีที่หลั่งออกมาจากตับเพื่อย่อยอาหารพวกไขมัน ความสามารถในการทนต่อเกลือแร่จะทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้

3. จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องส่งเสริมสุขภาพของ Host ให้ดีขึ้นได้ นอกจากจะต้องทนสภาวะต่าง ๆ แล้ว ยังต้องมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิด lactose intolerance ได้อีกด้วย อีกทั้งยังต้องมีคุณสมบัติในการช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกายและต้องป้องกันการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง ท้องเสีย โดยจะต้องไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยการแข่งขันกันในการยึดเกาะผนังลำไส้แย่งอาหาร และสร้างสารยับยั้งขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Fuller, 1993)

4. สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเกาะ และต่อต้านการเคลื่อนที่ของอาหารที่มีลักษณะเป็นลูกคลื่น ทำให้การย่อยและการดูดซึมอาหารเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

5. จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ ควรเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากสามารถทนต่อน้ำย่อยได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (นวลจันทร์, 2533)

#### 2.4.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

1. มีผลต่อระบบย่อยอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์นม ทำให้ผู้ที่แพ้นมสามารถบริโภคนมได้ง่ายขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส อีกทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 เป็นต้น และยังสังเคราะห์เอนไซม์มาช่วยย่อยโปรตีนให้มีประโยชน์ต่อร่างกายมากขึ้น

2. ช่วยลดความอ่อนแอของร่างกายต่อการติดเชื้อโรคต่าง ๆ โดยเมทาบอลิซึมของโพรไบโอติกจะมีผลต่อการควบคุมการติดเชื้อในลำไส้ ยับยั้งการเกิดมะเร็ง ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด และช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย (ปิ่นมณี, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตสารมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค และจะสร้างกรดบริเวณลำไส้ ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตสารที่มายับยั้งการก่อโรคต่าง ๆ ได้แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ซึ่งผู้ที่บริโภคโพรไบโอติกมีโอกาที่จะเกิดโรคต่าง ๆ ได้น้อยลง

## 2.5 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ มีรูปร่างกลม หรือเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะคเตเลส (Axelsson, 2004) จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน (Frazier and Westhoff, 1979) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมชาติค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน (เสาวนีย์, 2547) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ส่วน pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.8 ถึง 6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH < 5 อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง การทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp. แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ (Salminen and Wright, 19)

แบคทีเรียแลคติกที่เป็นโพรไบโอติก มีประโยชน์ในการช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส ที่มีในผลิตภัณฑ์นม ช่วยสร้างวิตามินที่จำเป็น ได้แก่ วิตามินบี B1, B2, B6, B12, niacin, folic acid และ pantothenic acid อีกทั้งช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยโปรตีน ช่วยควบคุมรักษาสสมดุลในลำไส้ และเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติก สามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ โดยสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้น มีดังนี้

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พวก *Lactobacillus* สะสมเพิ่มขึ้นใน อาหาร เนื่องจาก *Lactobacillus* ไม่มีเอนไซม์ catalase ที่เร่งปฏิกิริยา การย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนตมี lactoperoxidase เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตผลที่ยับยั้งจุลินทรีย์อื่น และยืดอายุการเก็บรักษาพบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ไดอะซีทอล (Diacetyl) เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก Diacetyl เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3. รูทีน (Ruterin) รูทีนเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็น  $\beta$ -hydroxy propionaldehyde ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีใน pH เป็นกลาง ได้จากพวกแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* รูทีนสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

## 2.6 โพรไบโอติกแบคทีเรีย สกุล *Lactobacillus plantarum*

### 2.6.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Lactobacillales

Family: Lactobacillaceae

Genus: *Lactobacillus*

Species: *Lactobacillus plantarum*

### 2.6.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

*Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบอยู่ในสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นแบคทีเรียที่เป็นเชื้อแบคทีเรียโพลาร์ มีรูปร่างเป็นท่อน้ำเล็ก ๆ ซึ่งจะประกอบไปด้วยเซลล์เดี่ยว มีขนาดประมาณ 0.5-1 ไมครอน ส่วนสีของ *Lactobacillus plantarum* จะออกเป็นสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน และมีรสชาติเป็นกรดปนเปรี้ยว จึงมักถูกใช้ในการผลิตอาหารแบบหลากหลาย เช่น การหมักน้ำผลไม้หรือกล้วยเหลือง เพื่อให้เกิดการหมักเกิดเป็นยาคาร์ และยังมีประโยชน์ในด้านสุขภาพเช่นกัน โดยเฉพาะการช่วยกระตุ้นระบบย่อยอาหารในลำไส้และรักษาความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า

### 2.6.3 แหล่งที่อยู่และสภาวะที่เหมาะสมของ *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* อาศัยอยู่ในลำไส้ มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 35 ถึง 38°C ที่ pH ที่เหมาะสมคือ 3.4-8.8 *Lactobacillus plantarum* สามารถพบได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ซึ่งรวมถึง

1. ในร่างกายมนุษย์ *Lactobacillus plantarum* เป็นส่วนหนึ่งของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งมักพบในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ การบริโภคอาหารที่มีเส้นใยอาหารสูงหรืออาหารที่มีโพรไบโอติกสูงสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* ในร่างกายได้
2. ในอาหาร *Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมักอาหาร เช่น หมักผลไม้เป็นน้ำผลไม้หรือเป็นยาคาร์บอ นอกจากนี้ยังมีการใช้ *Lactobacillus plantarum* ในการหมักเหล้าและผลิตเบียร์เพื่อสร้างรสชาติและกลิ่นที่พิเศษ
3. ในสิ่งแวดล้อม *Lactobacillus plantarum* สามารถพบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน, ผลไม้, พืช, ผลิตภัณฑ์แปรรูปอาหาร, และสิ่งอื่น ๆ เป็นต้น โดยสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรดปนเปรี้ยวสูงและมีอากาศที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะเป็นที่อยู่ที่เหมาะสมสำหรับ *Lactobacillus plantarum*

### 2.6.4 คุณสมบัติของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

1. เป็นแบคทีเรียระบบการทางเดินอาหาร *Lactobacillus plantarum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบอยู่ในระบบการทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ เชื้อชนิดนี้มีความเข้มข้นในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่เป็นส่วนสำคัญของชุดแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้และมีบทบาทในการสร้างสมดุลภายในระบบทางเดินอาหาร
2. การสร้างกรดน้ำตาล *Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำกระบวนการหมักได้ โดยการแปลงน้ำตาลในอาหารเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติกและกรดไลน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ความทนทานต่อสภาวะเชื้อโรค เชื้อ *Lactobacillus plantarum* มีความทนทานต่อสภาวะเชื้อโรคบางชนิด เช่น มีฤทธิ์ในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อโรคในระบบทางเดินอาหาร

4. การสร้างสารอนุมูลอิสระ *Lactobacillus plantarum* สามารถสร้างสารอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น วิตามิน และสารเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน

5. การช่วยในกระบวนการย่อยอาหาร เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ช่วยในกระบวนการย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหารในลำไส้ เช่น การย่อย

### 2.6.5 คุณลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

1. เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต โดยเชื้อจุลินทรีย์จะผลิตกรดแลคติกในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต

2. มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบริเวณลำไส้

3. มีความสำคัญในการสังเคราะห์และมีความสามารถในการดูดซึมวิตามินในลำไส้

4. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ แลคเตส ในการย่อยอาหาร

5. มีความสามารถในการช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

6. มีความสามารถในการช่วยควบคุมพีเอชในลำไส้

## 2.7 สาหร่ายที่เกี่ยวข้องกับพรีไบโอติก

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นชนิดของสาหร่ายที่มีขนาดเล็กกว่าสาหร่ายปกติ และเป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตในสภาวะที่มีการตกค้างในน้ำ สาหร่ายขนาดเล็กมีความหลากหลายทางชีวภาพและสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่อยู่ได้ดี สาหร่ายมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าทึ่ง และมีการนำมาใช้ในหลายองค์ประกอบระดับโลก ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และยังสามารถสร้างสารต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างเช่น สาหร่ายสามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดอาการเสื่อมสภาพของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ เช่น พอลิฟีนอล (polyphenol) ที่มีส่วนช่วยในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งสาหร่ายยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ซึ่งพรีไบโอติก (Prebiotic) คือ สารอาหารที่ไม่สามารถย่อยแยกได้โดยเอนไซม์ในร่างกายของเรา แต่สามารถให้ประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ (Probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และช่วยส่งเสริมสุขภาพของระบบทางเดินอาหารของเรา สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเป็นแหล่งพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ เนื่องจากมีปริมาณสารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น ไซโอโลสและเฟรคโตโอโลส (FOS) ซึ่งเป็นรูปแบบของโอลิโกแซคคาไรด์ การบริโภคพรีไบโอติกจากสาหร่ายขนาดเล็ก อาจมีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารของเรา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น สามารถส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมสารอาหาร และเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ścieszka *et al.* (2020) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของสภาพแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์ต่อระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ต่อการอยู่รอดของ *Lactobacillus* spp. โดยสาหร่ายที่ใช้ เป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* ทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus brevis* ในสภาพแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ลงไปในสภาพแวดล้อม จะเป็นการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยแสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตที่สูงในเกลือน้ำดี (0.4% และ 2.0%) และฟีนอล (0.4%)

Zhou *et al.* (2023) ได้ทำการประเมินผลกระทบของสารสกัดสาหร่ายเกลียวทอง *Spirulina*, *Chlorella* และ *Phaeodactylum tricornutum* ที่ได้จากการสกัดด้วยของเหลวด้วยความดัน (PLE) ต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ในหลอดทดลอง เมื่อเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิมแล้ว มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ผลของสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็กต่อแบคทีเรียเฉพาะกลุ่ม ได้รับการวิเคราะห์โดยเทคโนโลยี PCR เชิงปริมาณ และจำนวนการคัดลอกของยีนแบคทีเรียได้รับผลกระทบจากกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง ผลลัพธ์ GC-MS แสดงให้เห็นว่าการย่อยของสารชีวโมเลกุลของสาหร่ายขนาดเล็กส่งเสริมการปลดปล่อยกรดไขมันสายสั้น (SCFAs) ในระหว่างการหมัก ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าสารชีวโมเลกุลในสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กมีประโยชน์ต่อสุขภาพที่อาจเกิดขึ้นในลำไส้ของมนุษย์

de Medeiros *et al.* (2021) ได้ศึกษาผลของชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กที่ย่อยแล้วของ *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus maximus*, *Chlorococcum* sp. และ *Spirulina platensis* หรือ Fructo-oligosaccharides ในจุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์ระหว่างการหมักในหลอดทดลอง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง Fructo-oligosaccharides และชีวมวลของสาหร่ายได้เพิ่มปริมาณ *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Bifidobacterium* และลด *Prevotellaceae*, *Bacteroidceae*, *Clostridium historyticum* และ *Eubacterium rectale* และ *Clostridium coccoides* ลง ชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่ย่อยแล้วได้แสดงดัชนีพรีไบโอติกที่สูงกว่าฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งเห็นได้จากการยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์ในลำไส้ใหญ่

Ścieszka *et al.* (2021) ได้ทำการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากแลคโตส โดยใช้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งทำให้มีแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) เป็นจำนวนมาก และพบว่า อัตราการรอดชีวิตของ *Levilactobacillus brevis* tOCK 0944 ในเครื่องต้มจากถ้วยเหลืองที่ผสมกับ *Chlorella vulgaris* มีสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องต้มถั่วเหลืองที่ไม่มีสาหร่าย จึงสรุปได้ว่า *Chlorella vulgaris* สามารถเติมลงไปเครื่องต้มถั่วเหลืองหมักได้ และสามารถเพิ่มความอยู่รอดของ LAB ได้อีกด้วย

Hyrslava *et al.* (2021) ได้ทำการศึกษาการนำสาหร่าย *Chlorella vulgaris* มาผสมกับ *Bifidobacterium* โดยมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารที่มีประโยชน์ใหม่ ๆ โดย *Bifidobacterium* สายพันธุ์ในนมและหางนมที่เสริมด้วย *C. vulgaris* 1.0% (w/v) และศึกษาผลการปรับภูมิคุ้มกันของสารละลาย *Chlorella* ในน้ำ (0.5%, 1.0% และ 3.0%) ในเซลล์โมโนนิวเคลียร์ส่วนปลายของมนุษย์ นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์ผลเสริมฤทธิ์กันต่อการเผาผลาญไขมันของหนูที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับ *Chlorella* และ *B. animalis* subsp. พบว่า *Chlorella* มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตในเชิงบวกของ *Bifidobacterium* ที่ทดสอบ ( $p < 0.05$ ) และเพิ่มการหลั่งของไซโตไคน์ที่อักเสบอย่างมีนัยสำคัญ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ *Chlorella* ( $p < 0.05$ ) หลังจาก 8 สัปดาห์ จะเห็นผลการทำงานร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* กับ *Bifidobacterium* ต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ในหัวใจของหนู ตับ และซีรัม ( $p < 0.05$ ) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า การผสมกันระหว่าง *Chlorella* และ *Bifidobacterium* มีศักยภาพที่สำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์หมักใหม่ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย สายพันธุ์โพรไบโอติก รูปแบบการใช้งาน และความเข้มข้นสำหรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ยอมรับได้สำหรับผู้บริโภค

Narala *et al.* (2022) ได้ทำการศึกษา เพื่อพัฒนาไอศกรีมโยเกิร์ต-มังสวิรัต ที่ประกอบไปด้วยโปรตีนถั่วที่สกัดด้วยอินนูลินที่เป็นพรีไบโอติกสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโยเกิร์ต และศึกษาอิทธิพลของอินนูลินต่อคุณสมบัติของเนื้อสัมผัส เช่น ความแข็ง การละลาย และสี มีการทำ freeze dry ที่ 0.02% (w/v) ลงในของผสมที่ประกอบด้วยอินนูลิน 0, 1, 2, 3 และ 4% และบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงค่า pH ที่ 4.5 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในจำนวนของ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* เมื่อเติมอินนูลิน 2, 3 และ 4% และจำนวนคงไว้มากกว่า 6 log CFU/g ในช่วงเวลา 10 วันของการเก็บรักษา มีการโอเวอร์รันสูงสุด  $42.87 \pm 3.74\%$  ด้วยการเติมอินนูลิน 4% การหมักไอศกรีมผลไม้โปรตีนถั่วแสดงให้เห็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในความแข็งและเวลาที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเติมอินนูลินลงไป สรุปได้ว่าการเติมอินนูลินในโยเกิร์ต-ไอศกรีมโปรตีนถั่ว แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมพรีไบโอติก และมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติเนื้อสัมผัสในระหว่างการพัฒนาอาหารวิแกนโพรไบโอติก เพื่อเป็นทางเลือกจากนม

Tiengtam *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพรีไบโอติกของอินนูลินและแก่นตะวันต่อปลานิลวัยอ่อน โดยทดสอบด้วย 5 ทรีทเมนต์ (ทรีทเมนต์ละ 4 ชั่วโมง) มีส่วนประกอบของอินนูลินที่ 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5 และ 5 g kg<sup>-1</sup> และแก่นตะวันที่ 5 และ 10 g kg<sup>-1</sup> ทำการเลี้ยงปลาในบ่อคอนกรีตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ปลาที่ถูกเลี้ยงด้วยอินนูลินมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม และปลาที่เลี้ยงด้วยแก่นตะวัน มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดในบรรดาอาหารทั้งหมดที่ทดสอบ อินนูลินในอาหารและแก่นตะวัน ช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง ในบรรดาสารเคมี 14 ชนิดในเลือดที่ตรวจสอบ พบว่าอินนูลินหรือแก่นตะวันในอาหารทำให้ปริมาณกลูโคส อัลบูมิน โปตีน แมกนีเซียม แคลเซียม และธาตุเหล็กเพิ่มขึ้น การเสริมอินนูลินที่ 5 g kg<sup>-1</sup> สามารถปรับปรุงกิจกรรมของไลโซไซม์ และกิจกรรมทางเลือกเสริมของเม็ดเลือด 50 (ACH50) แก่นตะวันเพิ่ม

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวม กิจกรรมของไลโซไซม์ และกิจกรรม ACH 50 การค้นพบนี้ บ่งชี้ว่า อินนูลินที่  $5 \text{ g kg}^{-1}$  มีผลพรีไบโอติกที่เป็นประโยชน์กับปลาไนล้วยอ่อน และการเสริมโดยตรงด้วยแก่นตะวันที่  $10 \text{ g kg}^{-1}$  มีผลในเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพ ดังนั้นอินนูลินและแก่นตะวัน จึงมีศักยภาพที่ดีในการใช้เป็นพรีไบโอติกในอาหารปลา

Kanjan *et al.* (2017) ได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของอินนูลิน ในการเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* ของ *Lactobacillus paracasei* I321 ที่ย่อยสลายอินนูลินผ่านกลไกการหลั่งสารต้านแบคทีเรียและการยึดเกาะที่แข่งขันได้ อินนูลินส่งเสริมการยึดเกาะเชิงแข่งขันอย่างมีนัยสำคัญของ *L. paracasei* I321 ต่อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในอาหารที่เป็นแกรมลบจำนวนมาก *Salmonella Typhimurium* SA2093 ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ภายใต้ช่องที่มีการแข่งขันสูงของจุลินทรีย์ในอุจจาระ เมื่อใช้อินนูลิน, *L. paracasei* I321 และการรวมกันของซินไบโอติก เห็นได้ชัดว่าการเสริมด้วยอินนูลิน ช่วยลดการจำกัดสารอาหารในลำไส้ใหญ่ส่วนต้นที่เลียนแบบ ซึ่งนำไปสู่การทำลายเชื้อ *Salmonella* อย่างสมบูรณ์ สิ่งนี้ทำได้โดยการจัดการของ Bifidobacteria ในอุจจาระ ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนแปลงสารต้านแบคทีเรียอะซิเตตเป็นสารเมแทบอลิต์หลักที่สัมพันธ์กับจำนวนของ Bifidobacteria ในอุจจาระจำนวนมากเมื่อมีอินนูลิน ในขณะที่แลคโทสกลายเป็นโดมิแนนต์ เมื่อ *L. paracasei* I321 เข้าคู่กัน สายพันธุ์ที่ย่อยสลายอินนูลินนี้ สามารถคงอยู่และครอบงำในสภาพแวดล้อมการแข่งขันของจุลินทรีย์ในอุจจาระ และทำงานร่วมกับอินนูลิน เพื่อทำลายเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP Medium) สำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61
- 3.1.2 อาหาร MRS สำเร็จรูป ยี่ห้อ HIMEDIA สำหรับเลี้ยงและทดสอบการส่งเสริมการเจริญโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* (องค์ประกอบของอาหารอยู่ในภาคผนวก)
- 3.1.3 Liquid Paraffin Oil
- 3.1.4 เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.98
- 3.1.5 น้ำกลั่น
- 3.1.6 น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- 3.1.7 สารเคมีและสีสำหรับย้อมแกรม ได้แก่ Crystal violet, Safranin, สารละลายไอโอดีน และเอทิลแอลกอฮอล์ 95%
- 3.1.8 Dextrose Anhydrous (D-Glucose)
- 3.1.9 Inulin
- 3.1.10 Sodium Chloride (NaCl)

#### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright Field Microscope)
- 3.2.2 เครื่องชั่งน้ำหนักสัต์ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 3.2.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
- 3.2.4 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 3.2.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 3.2.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
- 3.2.8 ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ (Refrigerator)
- 3.2.9 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)
- 3.2.10 ภาดหลุม 96 หลุม (96-microwell plate)
- 3.2.11 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader)
- 3.2.12 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask)
- 3.2.13 กระบอกลูกวง (Graduated Cylinder)
- 3.2.14 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
- 3.2.15 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.2.16 ขวดเก็บสารฝาเกลียว ยี่ห้อ Duran
- 3.2.17 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- 3.2.18 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Eppendorf)
- 3.2.19 หลอดเซนตริฟิวก์ (Falcon Tube)
- 3.2.20 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.2.21 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tips)
- 3.2.22 เข็มเย็บเย็บ (Needle)
- 3.2.23 ห่วงเย็บเย็บ (Loop)
- 3.2.24 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
- 3.2.25 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
- 3.2.26 หลอดทดลอง (Test tube)
- 3.2.27 สไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 3.2.28 ปากคีบ (Forceps)
- 3.2.29 กระบอกใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.30 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- 3.2.31 เครื่องแช่แข็งสุญญากาศ (Freeze Dry)
- 3.2.32 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
- 3.2.33 เครื่องทำลายเซลล์อัลตราโซนิค (Sonicator)
- 3.2.34 ช้อนตักสารเคมีสแตนเลส (Spatula stainless)
- 3.2.35 โกร่งบดยา (Mortar and Pestle)

### 3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KLSc61
- 3.2.2 โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus Plantarum* JCM 1149

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การเตรียม TAP Medium สำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

จากตารางที่ ก.5 (ภาคผนวก) ทำการชั่งสารแต่ละชนิดดังตาราง ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ในขั้นตอนการเตรียม TAP agar มีขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับ TAP Broth จากนั้นใส่ agar 15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารที่ได้มาเทใส่เพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และทำ TAP slant โดยการนำ TAP agar ที่อุณหภูมิเย็นลง เทใส่หลอดทดลอง ระหว่างรออาหารแข็งตัวทำการเอียงหลอดทดลอง เพื่อให้ได้หลอดอาหารเอียง เมื่ออาหารแข็งตัว นำ TAP agar, TAP broth และ TAP slant เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

##### 3.4.1.1 สภาวะของการเลี้ยงสาหร่ายในการทดลองนี้

การเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ทุกการทดลอง เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 7,400 ลักซ์ หรือ  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  บนเครื่องเขย่า (Orbital shaker) ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญของสาหร่าย (Growth Curve)

ใช้ลูปเขี่ยหัวเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ปริมาตร 1 ลูป จากหลอดอาหารเอียงใส่ลงใน flask ขนาด 250 ml ที่มี TAP broth ปริมาตร 100 ml เลี้ยงภายใต้สภาวะของการทดลองนี้เป็นเวลา 2 วัน

ทำการถ่ายเชื้อสาหร่ายจากขวด stock ลงใน flask ขนาด 250 ml ที่มี TAP broth ปริมาตร 100 ml โดยให้มีเซลล์เริ่มต้นที่  $1 \times 10^5$  cell/ml จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และวัดค่าความหนาแน่นของสาหร่ายโดยใช้ Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนเซลล์ถึงระยะ Stationary Phase หรือประมาณ 10-12 วัน จากนั้นบันทึกอัตราการเจริญของสาหร่าย

### 3.4.1.3 การเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่ายและการสกัดสารจากสาหร่าย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยวิธีการเดียวกันกับการทำ Growth Curve ทำการเลี้ยงสาหร่ายปริมาตร 2.5 ลิตร จนถึงระยะ Stationary Phase หรือเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน (โดยทราบระยะเวลาได้จากการทำ Growth Curve ขั้นตอนก่อนหน้า) ทำการเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่าย (Biomass) โดยนำสาหร่ายที่เลี้ยงไว้มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ให้เซลล์ตกตะกอน ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกส่วนใสออก (Extracellular) และเก็บเฉพาะส่วนเซลล์ของสาหร่าย (Biomass) ที่เป็นตะกอนสีเขียว

การสกัดสารจากสาหร่าย (Intracellular) นำเซลล์ของสาหร่ายที่ได้จากการ Centrifuge ในขั้นตอนก่อนหน้ามาทำการแตกเซลล์ (Break cell) เริ่มจากนำเซลล์ของสาหร่ายแช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 mL และทำการแตกเซลล์ด้วยเครื่องทำลายเซลล์อัลตราโซนิค (Sonicator หรือ Portable Ultrasonic Cell Disruptor) ให้ทำการแตกเซลล์ 10 วินาที และหยุด 10 วินาที ทำสลับกันเป็นจำนวน 30 รอบ รวมเป็นเวลา 10 นาที เมื่อทำขั้นตอนการแตกเซลล์เสร็จแล้ว นำเซลล์สาหร่ายไป Centrifuge เพื่อกรองเอาเซลล์และสารสกัดออกจากกัน นำส่วนของกากเซลล์หรือตะกอนใสหลอดเก็บไว้ และนำสารสกัดที่ได้ไป Centrifuge อีกครั้ง ที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์หรือตะกอนต่าง ๆ ออกจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 100 mbar เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำระเหยออกจนเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของที่ใส่ไป ให้นำสารสกัดที่ได้และกากเซลล์ที่แยกเก็บไว้ ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องแช่แข็งสุญญากาศ (Freeze Dry) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง นำสารสกัดและกากเซลล์มาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้ลบกับน้ำหนักหลอด centrifuge เปล่า พร้อมฝาที่บันทึกไว้ก่อนหน้า นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญของ โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

#### 3.4.2.1 การเตรียม MRS medium

ซังอาหาร MRS สำเร็จรูป 55.15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1 ลิตร และการเตรียม MRS agar ซังอาหารสำเร็จรูป 55.15 g ใส่ agar 15 g (1.5% ต่อ น้ำ 1 ลิตร) ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อ MRS agar ที่อุณหภูมิอุ่นพอจับได้ เทใส่เพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออาหารแข็งตัว นำ MRS broth และ MRS agar เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

นำ Stock เชื้อ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 มาทำการ Activate โดยทำการ Cross Streak บน MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 3.4.2.3 การนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

ทำการเชยเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 บน MRS agar จากข้อ 3.4.2.2 ปริมาตร 1 ลูบ ใส่ลงในหลอดอาหารที่มี MRS broth ปริมาตร 5 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการถ่ายเชื้อใส่ปริมาตร 200  $\mu$ L ใส่ลงในหลอดอาหารที่มี MRS broth ปริมาตร 5 mL หลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader) ทุกๆ 2 ชั่วโมง (โดยเริ่มชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 12) จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วง mid-log phase คือ 0.3

จากนั้นนำเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วง log phase ที่ได้ มาทำการเจือจาง NaCl (Sodium Chloride) โดยทำการเจือจางให้มีระดับการเจือจางตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-10}$  ทำการ drop plate เพื่อนับเซลล์ โดยการ drop plate ระดับการเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการนับจำนวนโคโลนีในหน่วย CFU/mL โดยมีวิธีการคำนวณคือ

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับความเจือจาง X ปริมาตรอาหาร}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2.4 การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย, สารละลายน้ำตาลกลูโคส, สารละลายอินนูลิน และกากเซลล์ เพื่อใช้ในการทดสอบส่งเสริมการเจริญโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

นำสารสกัดจากสาหร่ายและกากเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้า มาทำการละลายด้วย น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสด้วยน้ำกลั่น และนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนสารละลายอินนูลิน ทำการละลาย อินนูลินโดยใส่ลงไปใต้น้ำกลั่น และนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยในการทดลองจะใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v)

แต่เนื่องจากในการทดลองจะต้องมีการใส่อาหาร MRS broth เพื่อให้แบคทีเรียสามารถ เจริญเติบโตได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายต่าง ๆ จะถูกเจือจางลงครึ่งหนึ่ง จึงต้องเตรียมสารละลายต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นเป็น 4% (w/v) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปผสมกับ MRS broth ในอัตราส่วน 1:1 คือ MRS broth 2.5 mL และสารละลายต่าง ๆ 2.5 mL เมื่อสารละลายถูกเจือจางลงครึ่งหนึ่ง จะได้ MRS broth ที่มีสารละลายต่าง ๆ ในความเข้มข้นที่ต้องการ

### 3.4.2.5 การวัดการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

ใส่สารละลายจำนวน 4 อย่าง ได้แก่ สารละลายสารสกัดจากสาหร่าย, สารละลาย กากเซลล์, สารละลายน้ำตาลกลูโคส และสารละลายอินนูลิน ปริมาตรอย่างละ 2.5 mL ลงในหลอดทดลองที่มี MRS broth อยู่หลอดละ 2 mL ทำการเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรีย โดยเตรียมให้โพรไบโอติกแบคทีเรีย ในอาหาร MRS broth ให้มีปริมาณเชื้อ  $1 \times 10^6$  CFU/mL จากนั้นใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายต่าง ๆ ที่ได้ ใส่ไว้ในข้างต้น ปริมาตรหลอดละ 60  $\mu$ L และปรับปริมาตรด้วย MRS broth จนครบ 5 mL โดยมี Negative control คือ เชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียและอาหาร MRS broth และ Positive control คือ เชื้อโพรไบโอติก แบคทีเรียและอาหาร MRS broth ที่ได้ใส่สารละลายต่าง ๆ ไว้ เมื่อทำการเตรียมเรียบร้อยแล้ว นำหลอดทดลอง ไปปั่นในตู้ปั่นเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเจือจางสารละลายต่าง ๆ ด้วย NaCl โดยในช่วงที่ 0 และ 6 ทำการเจือจางให้มีระดับการเจือจางตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-6}$  ทำการ drop plate เพื่อนับเซลล์ โดย drop plate ระดับการเจือจางที่  $10^{-4}$  ถึง  $10^{-6}$  ระดับการเจือจางละ 3 ซ้ำ ในช่วงที่ 12 และ 24 ทำการเจือจางให้มี ระดับการเจือจางตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-8}$  ทำการ drop plate เพื่อนับเซลล์ โดย drop plate ระดับการเจือจางที่  $10^{-6}$  ถึง  $10^{-8}$  ระดับการเจือจางละ 3 ซ้ำเช่นเดียวกัน จากนั้นนำ plate ไปปั่นในตู้ปั่นเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการนับจำนวนโคโลนีในหน่วย CFU/mL จากนั้นนำค่าที่ได้มาทำ กราฟการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics Data Editor



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

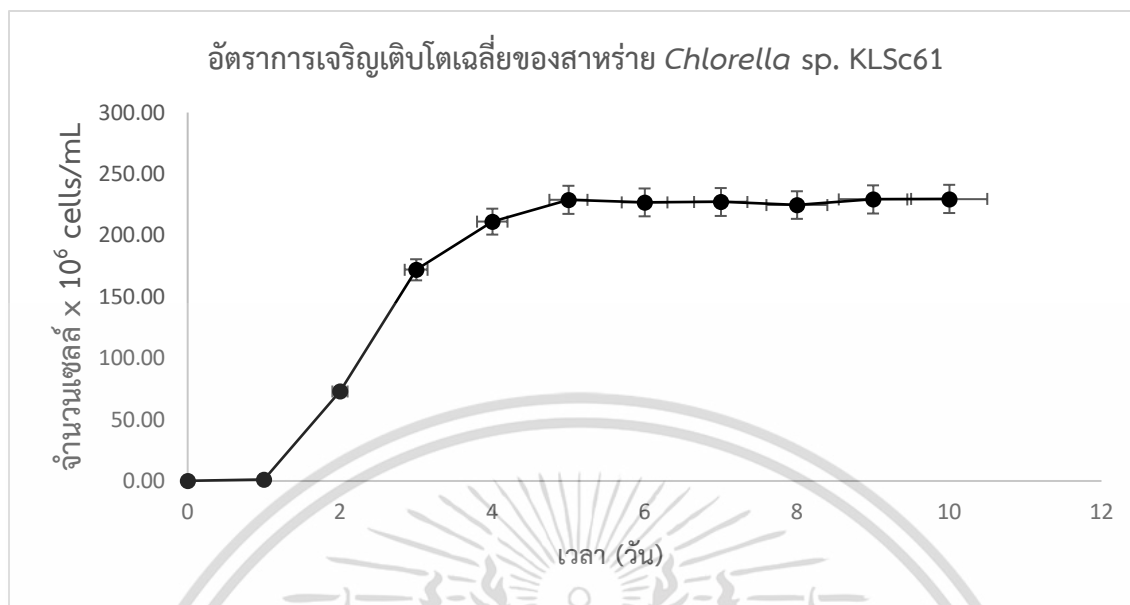
#### 4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

การทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ใน TAP broth จำนวน 4 flask ทำการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน จากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ในวันที่ 0-1 สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 อยู่ในระยะ Lag phase หลังจากวันที่ 1 สาหร่ายได้เริ่มมีการแบ่งตัวแบบทวีคูณ (Log phase) และหลังจากวันที่ 3 เป็นต้นไป สาหร่ายได้เข้าสู่ Early Stationary Phase และ Stationary Phase ตามลำดับ ซึ่งสังเกตได้จากการแบ่งตัวของสาหร่ายเริ่มไม่เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ และจำนวนเซลล์เริ่มเข้าสู่ปริมาณที่คงที่ นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนเซลล์สะสมมากที่สุดของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 อยู่ประมาณวันที่ 5-6 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงของห้องปฏิบัติการครั้งนี้ แสดงดังรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 จากการทดลองผู้วิจัยได้ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายในวันที่ 5 ซึ่งอยู่ในระยะ Early Stationary Phase มาเพื่อทำการทดลองต่อไป เนื่องจากคาดว่าเป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตเต็มที่ และสะสมสารสำคัญที่อาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

ตารางที่ 4.1 ค่าปริมาณของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

วันที่	จำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$ cells/mL)				เฉลี่ย
	flask ที่ 1	flask ที่ 2	flask ที่ 3	flask ที่ 4	
0	0.15	0.15	0.13	0.11	0.14
1	1.23	1.18	1.37	1.43	1.30
2	91.90	63.90	65.93	69.80	72.88
3	201.60	160.60	153.60	172.00	171.95
4	219.67	206.67	209.67	208.67	211.17
5	225.00	223.67	242.67	224.33	228.92
6	222.67	221.00	234.33	229.33	226.83
7	227.67	225.33	230.30	225.33	227.16
8	219.33	227.33	217.33	234.67	224.67
9	227.67	234.00	228.67	226.67	229.25
10	228.00	230.67	228.00	232.00	229.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



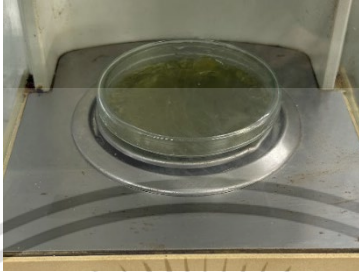

รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์โดยเฉลี่ย จากการทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

#### 4.2 ปริมาณน้ำหนักรสสกัดและกากเซลล์ที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

ในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อที่จะเตรียมสารใช้ทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ Intracellular และกากเซลล์ โดยแต่ละสารทดสอบจะได้อมาจากปริมาณเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร เมื่อได้เซลล์สดแล้วจึงทำการสกัดด้วยน้ำกลั่น ผลการทดลองพบว่า จากสาหร่ายปริมาตร 2.5 ลิตร สามารถได้อมาซึ่งสารสกัด Intracellular และกากเซลล์ คือ 0.45 และ 0.83 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารสกัดและกากเซลล์แห้งจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

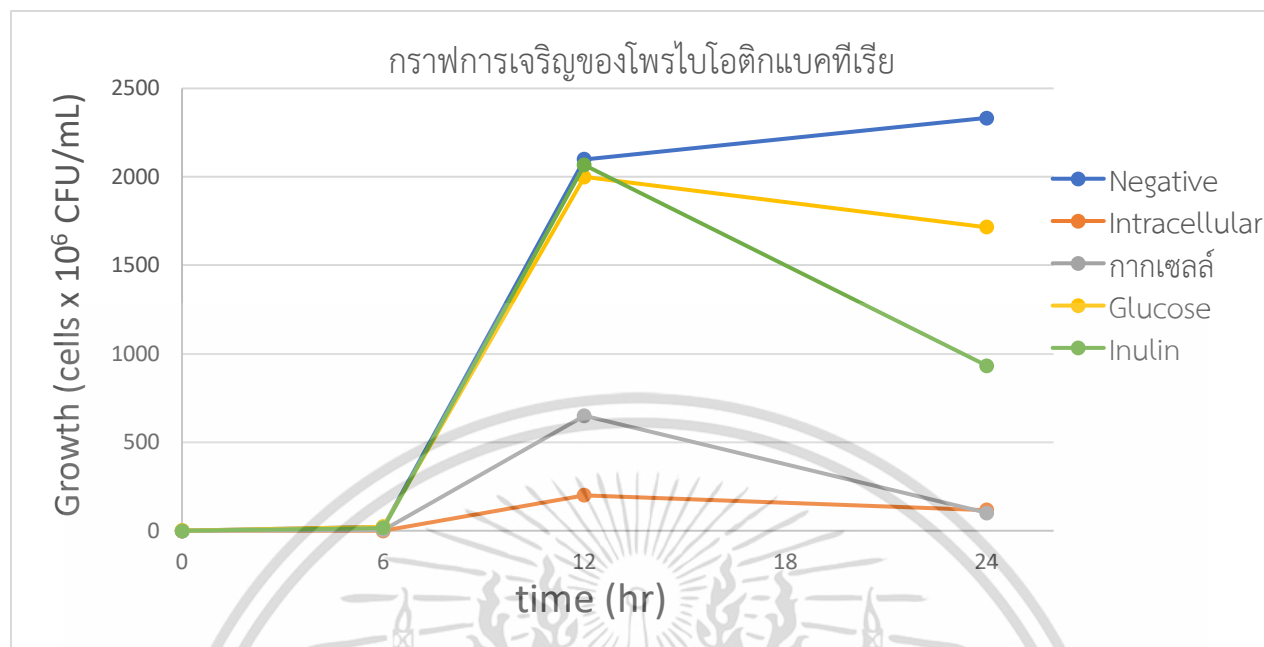
สารสกัดและชีวมวล	รูปภาพสารที่ได้จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61	ปริมาณสารที่ได้จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61
Intracellular		0.45 กรัม
กากเซลล์		0.83 กรัม

จากงานวิจัยของกฤษณา และคณะ (2564) ได้ทำการสกัดสารจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยใช้ตัวทำละลายคือเอทานอล 60% พบว่า ได้ปริมาณ intracellular คือ 0.62 กรัมต่อลิตร การใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันอาจส่งผลต่อสารสกัดที่ได้จากเซลล์สาหร่าย ในการทดลองนี้ ใช้น้ำกลั่นในการสกัด เนื่องจากน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายที่มีขี้ และคาดว่าจะมีฤทธิ์ในการสกัดสาร จากผลการทดลอง พบว่า การใช้น้ำกลั่นในการสกัด ทำให้ได้สารสกัดในปริมาณที่น้อย ดังนั้น น้ำกลั่นอาจไม่มีฤทธิ์ในการสกัดสารมากพอ ทำให้สารเกิดการตกค้างอยู่ในเซลล์

#### 4.3 ผลการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 หลังจากระดมสารสกัดและกากเซลล์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ลงในอาหาร

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำสารสกัดและกากเซลล์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ได้ในการทดลองที่ 4.2 มาทดสอบการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 จากผลการทดลอง เมื่อเติมสารสกัด Intracellular และกากเซลล์ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) เปรียบเทียบกับการเติมกลูโคส และอินนูลิน แสดงดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 หลังจากเติมสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัด Intracellular และกรากเซลล์ที่แยกจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 และผลการทดลองของอินนูลินไม่สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยเกิดขึ้น จึงไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้ โดยจากงานวิจัยของณัฐนันท์ และคณะ (2562) ได้ทำการทดสอบการใช้อินนูลินเป็นสารเสริมโพรไบโอติกในปลาตุ๊กตากลผสม พบว่า การเสริมอินนูลินที่ระดับ 1% ทำให้แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria และ แบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. เพิ่มจำนวนสูงขึ้น และสามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตและสุขภาพของลูกปลาตุ๊กตากลผสมได้ และจากงานวิจัยของเอกภพ (2555) ที่พบว่า สารสกัดจากแก่นตะวันที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกหรือกล่าวได้ว่าแก่นตะวันมีประสิทธิภาพต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งจากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ โดยพบว่า อินนูลินที่ได้จากผลการทดลองนั้น ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ได้ไม่ดี เมื่อเทียบกับตัวแปรที่ควบคุม (Negative control)

จากงานวิจัย Ścieszka and Klewicka (2020) ที่ได้ศึกษา *Lactobacillus brevis* (ŁOCK 0944, ŁOCK 0980, ŁOCK 0992 และ MG451814) ที่แยกได้จากผักและเห็ดหมัก ในการทดลองได้ใช้ *Chlorella vulgaris* แบบผง และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ซึ่งเติมสารสกัดจากสาหร่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.5% (w/v) สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0944 ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมซีวมวล ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ โดยอาจเกิดจากตัวทำละลายที่ใช้แตกต่างกัน ส่งผลให้ intracellular ละลายได้ไม่ดีพอ ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญได้ไม่ดีพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KSLc61 ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการ มาทดสอบเพื่อดูการส่งเสริมการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย คือ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ซึ่งจากการทดลอง การทดสอบสารสกัด Intracellular และ กากเซลล์แห้งของสาหร่ายต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย โดยใช้ Intracellular และ กากเซลล์ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) เมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส และอินนูลิน ผลการทดลองพบว่า สารสกัด Intracellular และ กากเซลล์ไม่ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่เคยเกิดขึ้น จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า สารสกัด Intracellular และ กากเซลล์ มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกหรือไม่

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการสกัดสารจากสาหร่ายโดยใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ เช่น เอทานอล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย
2. ศึกษาหองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสาหร่าย เพื่อจะได้ทราบถึงส่วนประกอบที่ชัดเจนของสารที่สำคัญในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย
3. ศึกษาสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLS61 เพื่อดูฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรีย
4. ศึกษาเพิ่มเติมและทำการทดลองซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กฤษณา จันทร์เสงี่ยม, พงศธร ใจเที่ยง และพิมพ์วัลลภช์ บัวเสถียร. 2564. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและคุณสมบัติฟรีไบโอติกของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLS61. วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จารุณี ควรพิบูลย์ และ ประกานต์ ฤดีกุลธำรง. 2555. ฟรีไบโอติก: อาหารส่งเสริมสุขภาพ. ธรรมศาสตร์เวชสาร. สาขาวิชาชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 12(2): 362-369.
- ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภู่ปริชา. 2556. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ฟรีไบโอติกที่มีส่วนผสมของฟรีไบโอติกจากถั่วเหลืองและโปรไบโอติก เพื่อต้านการอักเสบของระบบทางเดินอาหาร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- บุญยสิริ บุญเป็ง, ขวโรจน์ ใจสิน และ กฤษดา ยิ่งขยัน. 2562. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยระบบควบคุมปริมาณความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์. วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- พงษ์ไพท กิจรุ่งโรจนพร. 2560. การเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เลี้ยงในน้ำเสียจากโรงฆ่าสุกร. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- มณีรัตน์ เพ็ชรเส่ง และ เอกนารี ไกรเทพ. 2560. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล. วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- รัชฎาพร อุ่นศิริไฉย. 2556. การแยกเชื้อโปรไบโอติกจากกากมันสำปะหลัง. สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วสันต์ สุมินทิลี, ปนิตา บรรจงสินศิริ, จันทนา ไพโรบูรณ์ และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. 2556. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) สาหร่ายทุ่น (*Sargassum oligocystum*) และสาหร่ายเขากวาง (*Gracilaria changii*). วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม.
- วัชร เวียงแก้ว. 2552. รายงานวิจัยเรื่องการสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สรนัฎร เทียมดาว. 2559. เอกสารประกอบการสอนสาหร่ายวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- สุธิดา เชื้อพานิช, นิพนธ์ ทวีชัย, ปทุมพร ฉิมอเนก และ วรณา มาลาพันธ์. 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคทีเรียโอสิน และเจริญได้ดีในสารโอลิโกแซคคาไรด์. สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพจน์ นวลละออง. 2552. การสกัดสารฟรื่อโอสินจากพืชเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภัจฉรา นพจินดา. 2557. โพรโอสินกับการส่งเสริมสุขภาพ. วารสารพยาบาลทหารบก 15: 430-435.
- เอกภพ สีนงาม. (2555). การศึกษาคุณสมบัติความเป็นฟรื่อโอสินของฟรูกโตโอสินโอสินที่ได้จากแก่นตะวัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัย ศิลปากร.
- Buddington, K. K., Donahoo, J. B. and Buddington, R. K. 2002. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. The Journal of nutrition, 132(3): 472-477.
- Chankhong, K., Chotigeat, W. and Lewkittayakorn, J. 2018. Effects of culture medium on growth kinetics and fatty acid composition of *Chlorella* sp. T12. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 40(5): 1098-1104.
- De Medeiros, V. P. B., de Souza, E. L., de Albuquerque, T. M. R., da Costa Sassi, C. F., dos Santos Lima, M., Sivieri, K. and Magnani, M. 2021. Freshwater microalgae biomasses exert a prebiotic effect on human colonic microalgae. Algal Research, 60: 102547.
- Fook, J. L., Fuller, R. and Gidson, R. G. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. International Dairy Journal. 9: 53-61.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotic. Journal of Nutrition. 125: 1404-1412.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (2008). Handbook of prebiotics. 1st ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Hyslova, I., Krausova, G., Smolova, J., Stankova, B., Branyik, T., Malinska, H., Huttel, M., Kana, A., Duskocil, I. and Curda, L. 2021. Prebiotic and Immunomodulatory Properties of the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Microalgae *Chlorella vulgaris* and Its Synergistic Triglyceride-Lowering Effect with Bifidobacteria. *Fermentation*, 7(3): 125.
- Kanjan, P. and Hongpattarakere, T. 2017. Prebiotic efficacy and mechanism of inulin combined with inulin-degrading *Lactobacillus paracasei* I321 in competition with *Salmonella*. *Carbohydrate Polymers*, 169: 236-244.
- Kao, C. Y., Chen, T. Y., Chang, Y. B., Chiu, T. W., Lin, H. Y., Chen, C. D., *et al.* (2014). Utilization of carbondioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp. *Bioresour Technol.* 166: 485-493.
- Narala, V. R., Jugbarde, M. A., Orlovs, I. and Masin, M. 2022. Inulin as a prebiotic for the growth of vegan yoghurt culture in pea protein-based vegan yoghurt-ice cream, white improving the textural properties. *Applied Food Research*, 2: 100136.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Awasthi, M. K., Varjani, S., Bhatia, S. K., Tsai, M. L., Hsieh, S. L., Chen, C. W., and Dong, C. D. (2021). Emerging prospects of macro - and microalgae as prebiotic. A Review. *Microbial Cell Factories* 20:112, 16 pages.
- Ścieszka, S. and Klewicka, E. 2020. Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 133: 109936.
- Ścieszka, S., Gorzkiewicz, M. and Klewicka, E. 2021. Innovation fermented soya drink with the microalgae *Chlorella vulgaris* and the probiotic strain *Levilactobacillus brevis* LOCK 0944. *LWT*, 151: 112131.
- Tientam, N., Khempaka, S., Paengkoum, P. and Boonanuntanasarn, S. 2014. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology*, 207: 120-129.
- Zhou, J., Wang, M., Bäuerl, C., Macías, E. C., Lerma, J. C., Collado, M. C. and Barba, F. J. 2023. The impact of liquid-pressurized extracts of *Spirulina*, *Chlorella* and *Phaedactylum tricornutum* on *in vitro* antioxidant, antiinflammatory and bacterial growth effects and gut microbiota modulation. *Food Chemistry*, 401: 134083.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียม Stock Solution เพื่อใช้ในการเตรียมอาหาร TAP Medium

ตารางที่ ก.1 การเตรียม 1 M Tris Base ปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)
1 M Tris Base	121.14

ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

ตารางที่ ก.2 การเตรียม Phosphate Buffer II ปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)
Dipotassium Hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	108.00
Potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ )	56.00

ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

ตารางที่ ก.3 การเตรียม Solution A ปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)
Ammonium chloride ( $NH_4Cl$ )	40.00
Magnesium Sulfate Heptahydrate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	10.00
Calcium Chloride Dihydrate ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	5.00

ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.4 การเตรียม Hutner's Trace Element ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)
EDTA disodium salt	10.00
Zinc Sulfate Heptahydrate ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	11.00
Boric acid ( $H_3BO_3$ )	2.85
Manganese (II) chloride Tetrahydrate ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	5.06
Cobalt (II) Sulfate Hexahydrate ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	1.61
Copper (II) Sulfate Pentahydrate ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	1.50
Ammonium Heptamolybdate tetrahydrate ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ )	1.10
Ferrous Sulfate heptahydrate ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	4.99

ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร

Stock Solution ทุกชนิด เมื่อเตรียมเสร็จแล้ว นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ก.5 การเตรียม Tris-Acetate-Phosphate (TAP) Medium ปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ (mL/L)
1 M Tris Base	20.0
Phosphate Buffer II	1.0
Solution A	10.0
Hutner's Trace Element	10.0
Glacial acetic acid	1.0
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร	

การเตรียม TAP broth ใช้ 1 M Tris Base 20 mL, Phosphate Buffer II 1 mL, Solution A 10 mL, Hutner's Trace Element 1 mL และ Glacial acetic acid 1 mL ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร การเตรียม TAP agar มีขั้นตอนเหมือนกับการเตรียม TAP broth โดยใส่ agar ลงไป 15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อ TAP agar อุณหภูมิเย็นลงให้นำมาเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทลงบนเพลทแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และทำ TAP slant โดยการนำ TAP agar ที่อุณหภูมิเย็นลง เทใส่หลอดทดลอง ระหว่างรออาหารแข็งตัว ทำการเอียงหลอดทดลอง เพื่อให้ได้หลอดอาหารเอียง เมื่ออาหารแข็งตัว นำ TAP broth และ TAP agar และ TAP slant เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### การเตรียม MRS Medium ปริมาตร 1 ลิตร ใช้อาหารสำเร็จรูป ยี่ห้อ HIMEDIA

ตารางที่ ก.6 องค์ประกอบของอาหาร MRS Medium สำเร็จรูป ยี่ห้อ HIMEDIA

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)
Proteose peptone	10.00
Beef extract	10.00
Yeast extract	5.00
Dextrose	20.00
Polysorbate (Tween-80)	1.00
Ammonium citrate	2.00
Sodium acetate	5.00
Magnesium sulphate	0.10
Manganese sulphate	2.00
Dipotassium phosphate	

การเตรียม MRS Medium ซึ่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1 ลิตร และการเตรียม MRA agar ซึ่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 g และใส่ agar 15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อ MRS agar อุณหภูมิเย็นลงให้นำมาเทลงบนเพลทแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออาหารแข็งตัว นำ MRS broth และ MRS agar เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

## การเตรียมสารละลาย

การเตรียม 0.85% NaCl ปริมาตร 1 ลิตร

ตารางที่ ข.1 องค์ประกอบของ 0.85% NaCl

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)
Sodium Chloride (NaCl)	8.5

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และอินนูลิน

ตารางที่ ข.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และอินนูลิน ที่ความเข้มข้น 2%(w/v)

สารเคมี	ปริมาณ (g)	น้ำกลั่น (mL)
Glucose	0.2	10
Inulin	0.2	10

นำสารละลายน้ำตาลกลูโคส ไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนสารละลายอินนูลิน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

## สูตรการคำนวณ

## การคำนวณปริมาณสาหร่ายที่ต้องการใช้จากขวด Stock

นำค่าที่ได้จากการนับเซลล์มาคำนวณ โดยใช้สูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$C_1$  = ความเข้มข้นเริ่มต้น

$C_2$  = ความเข้มข้นที่ต้องการ

$V_1$  = ปริมาตรเริ่มต้น

$V_2$  = ปริมาตรที่ต้องการ

## การนับจำนวนโคโลนีในหน่วย CFU/mL

มีวิธีการคำนวณคือ

CFU/mL =

ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร

ระดับความเจือจาง X ปริมาตรอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

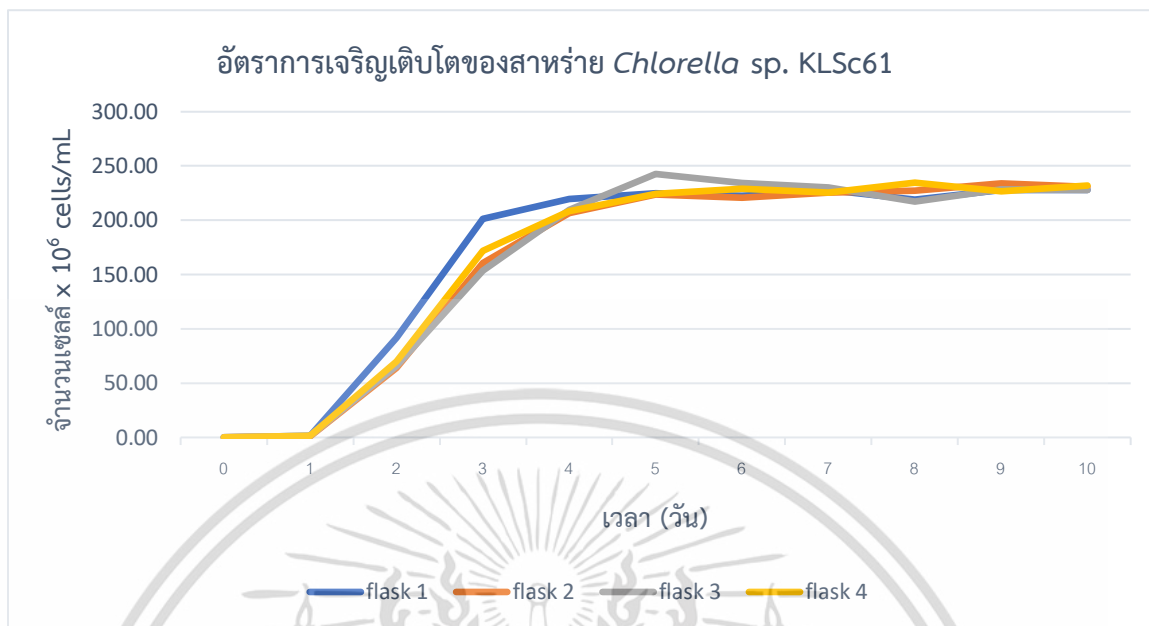
## ผลการวิจัย

อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

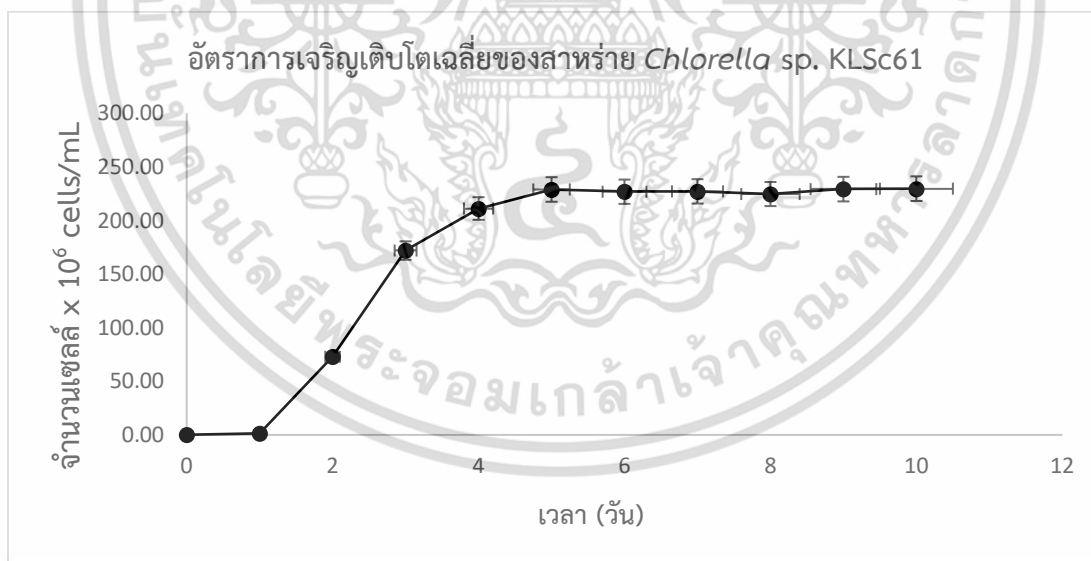
ตารางที่ ง.1 แสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ที่นับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

วันที่	จำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$ cells/mL)				
	flask ที่ 1	flask ที่ 2	flask ที่ 3	flask ที่ 4	เฉลี่ย
0	0.15	0.15	0.13	0.11	0.14
1	1.23	1.18	1.37	1.43	1.30
2	91.90	63.90	65.93	69.80	72.88
3	201.60	160.60	153.60	172.00	171.95
4	219.67	206.67	209.67	208.67	211.17
5	225.00	223.67	242.67	224.33	228.92
6	222.67	221.00	234.33	229.33	226.83
7	227.67	225.33	230.30	225.33	227.16
8	219.33	227.33	217.33	234.67	224.67
9	227.67	234.00	228.67	226.67	229.25
10	228.00	230.67	228.00	232.00	229.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ





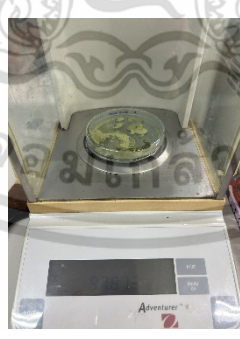
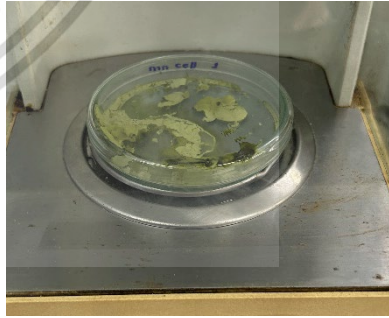


รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์โดยเฉลี่ย จากการทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำหนักรสสกัดและกากเซลล์ที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella sp.* KLSc61

ตารางที่ ง.2 น้ำหนักหลอด Centrifuge เปล่าพร้อมฝา (g) และน้ำหนักชีวมวลสาหร่ายและสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella sp.* KLSc61

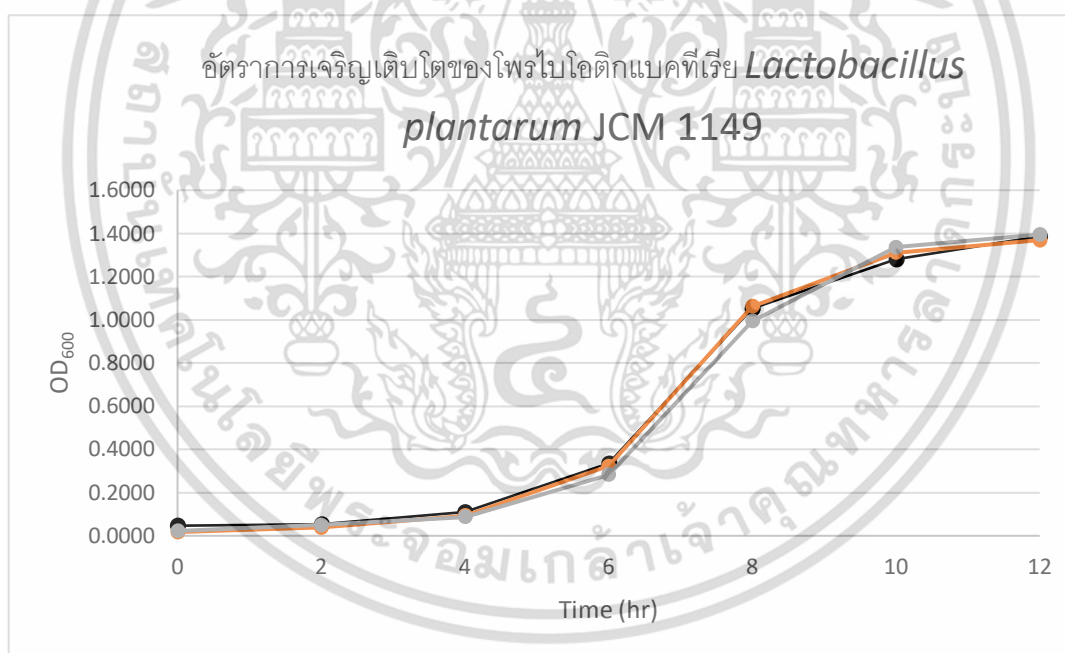
สารที่ได้จากสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> KLSc61	น้ำหนักเพลตเปล่า (g)	น้ำหนักเพลตเปล่าและสารสกัด (g)	น้ำหนักที่ได้ (g)	รูปภาพที่ได้จากสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> KLSc61
Intracellular	 89.0040	 89.445	0.441	
กากเซลล์	 97.0435	 97.872	0.83	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อัตราการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

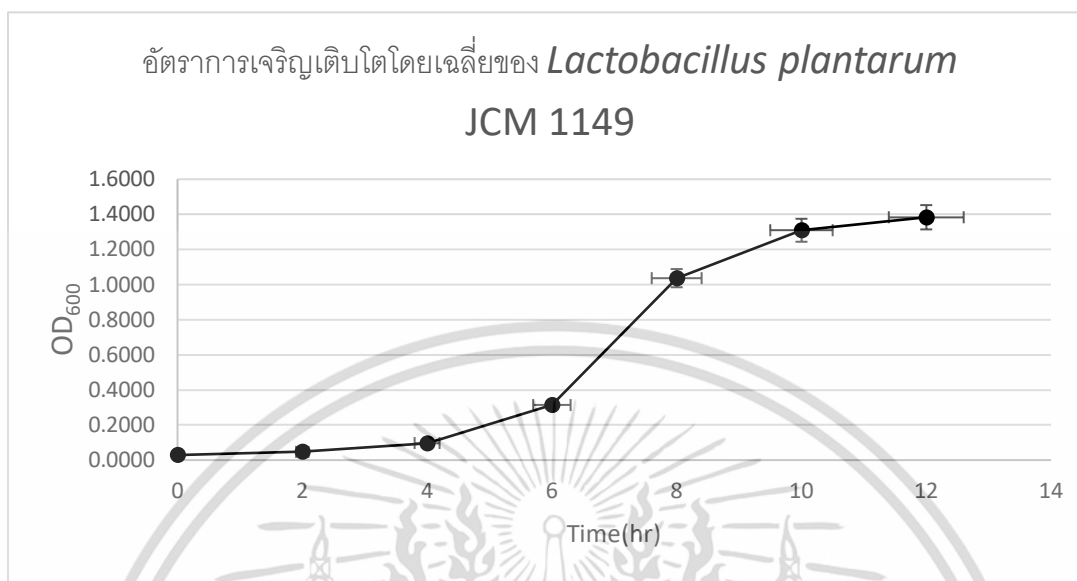
ตารางที่ ง.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	O.D. 600 nm			
	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.0467	0.0173	0.0223	0.0288
2	0.0523	0.0387	0.0497	0.0469
4	0.1113	0.0937	0.0870	0.0973
6	0.3357	0.3223	0.2827	0.3136
8	1.0533	1.0617	0.9943	1.0364
10	1.2813	1.3110	1.3357	1.3093
12	1.3863	1.3690	1.3950	1.3834



รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

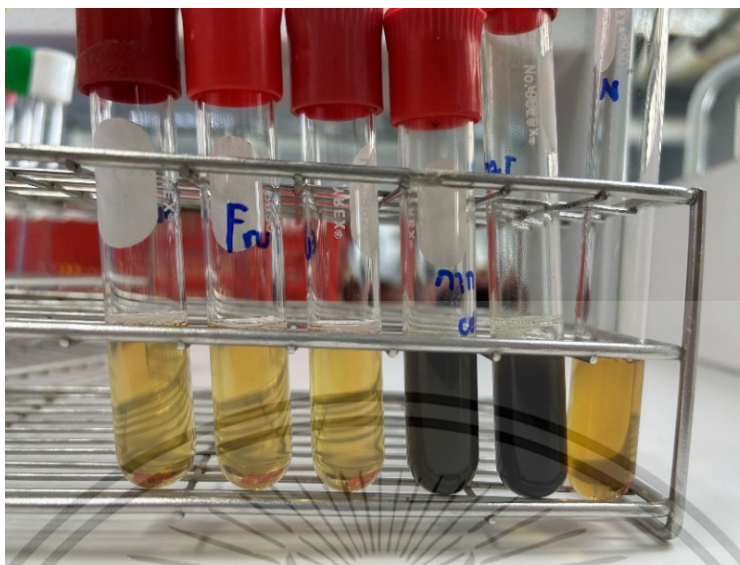


รูปที่ ง.4 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย

#### การส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยการเติมสารสกัดและกากเซลล์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

ในการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรียของสารสกัดและกากเซลล์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 โดยการตรอปเพลท แล้วนับจำนวนเซลล์ ในชั่วโมงที่ 0, 6, 12 และ 24 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย, กากเซลล์, สารละลายน้ำตาลกลูโคส และสารละลายอินนูลิน ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ดังแสดงในรูป ง.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

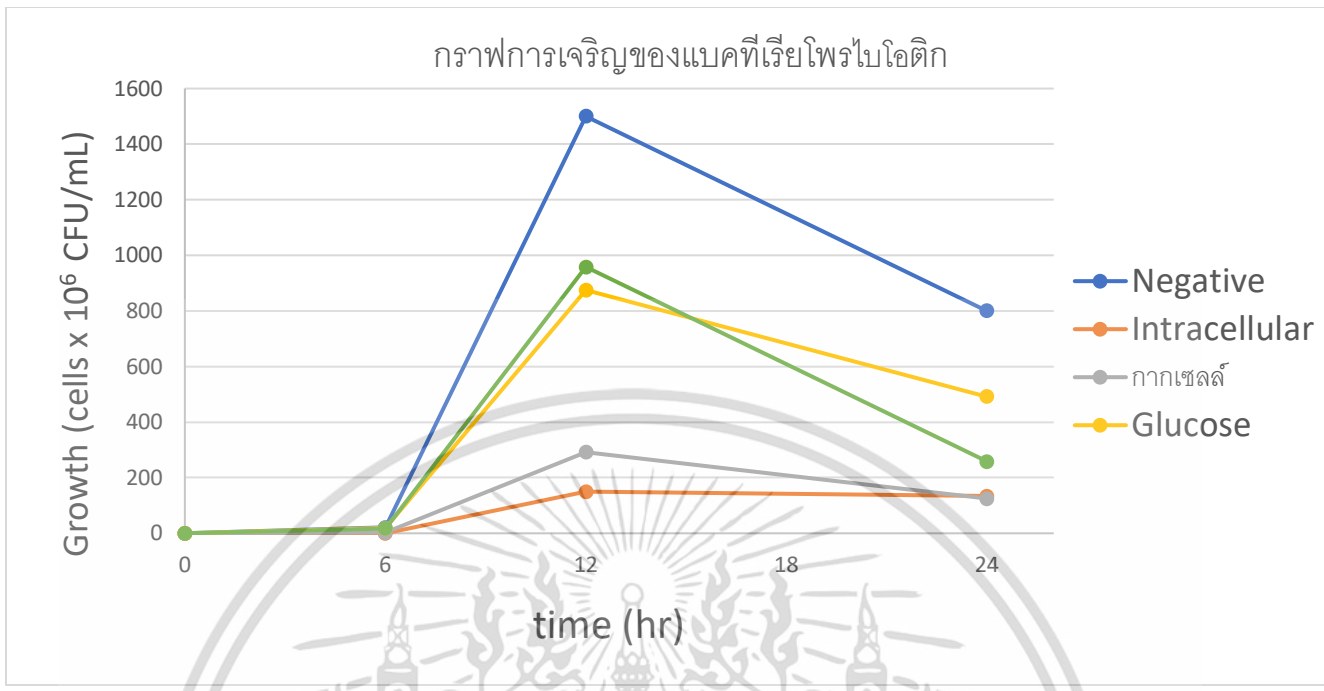


รูปที่ ง.5 หลอดทดลองของอาหาร MRS ผสมกับสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v)

ตารางที่ ง.4 จำนวนเซลล์ที่นับได้จากการดรอเพลทของสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) และ growth control เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ซ้ำที่ 1

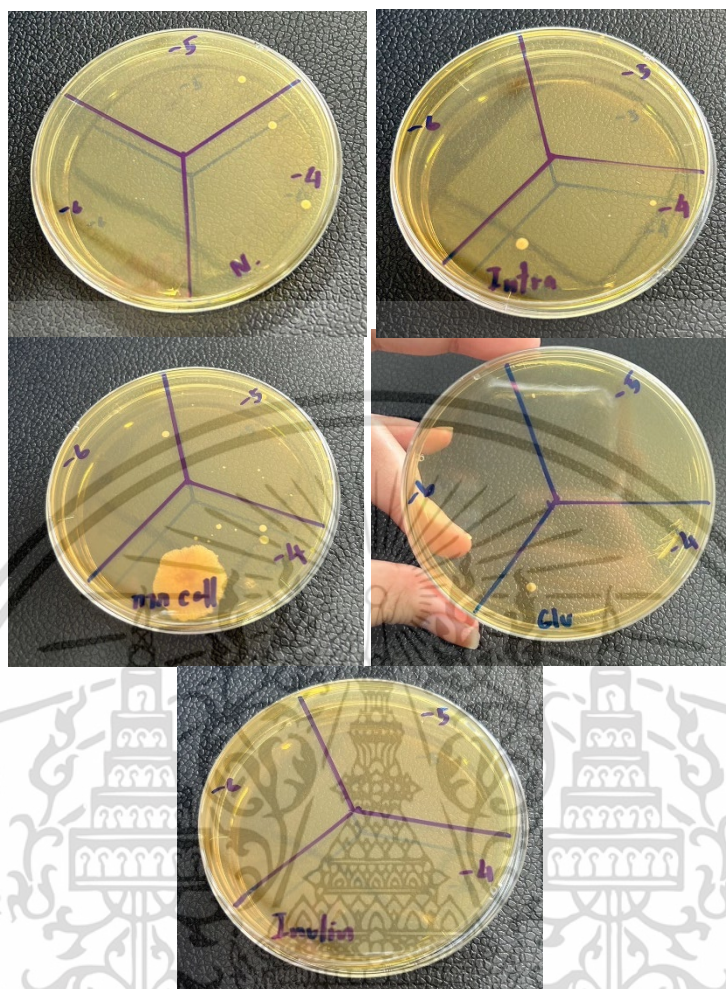
ชั่วโมงที่	Growth control	สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2%(w/v)			
		Intracellular	กากเซลล์	Glucose	Inulin
0	0.25	0.17	0.5	0.083	0
6	20.83	0	2.5	19.167	17.5
12	1500	150	291.67	875	958.33
24	800	133.33	125	491.67	258.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



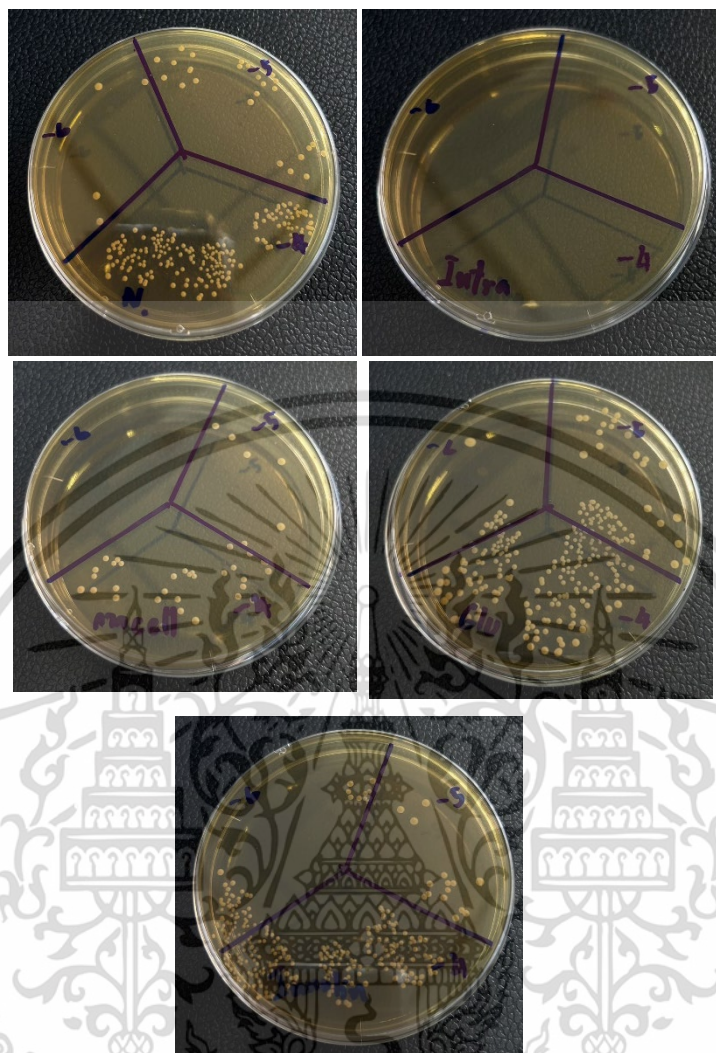
รูปที่ ง.6 กราฟการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 หลังจากใส่สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



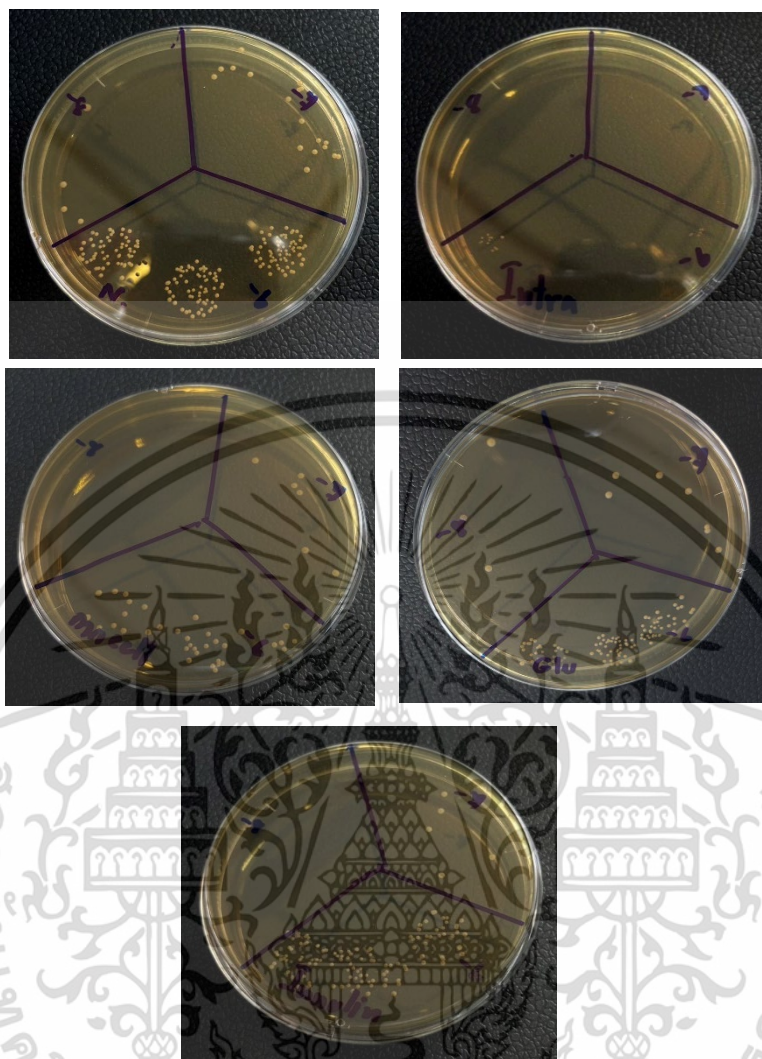
รูปที่ ง.7 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



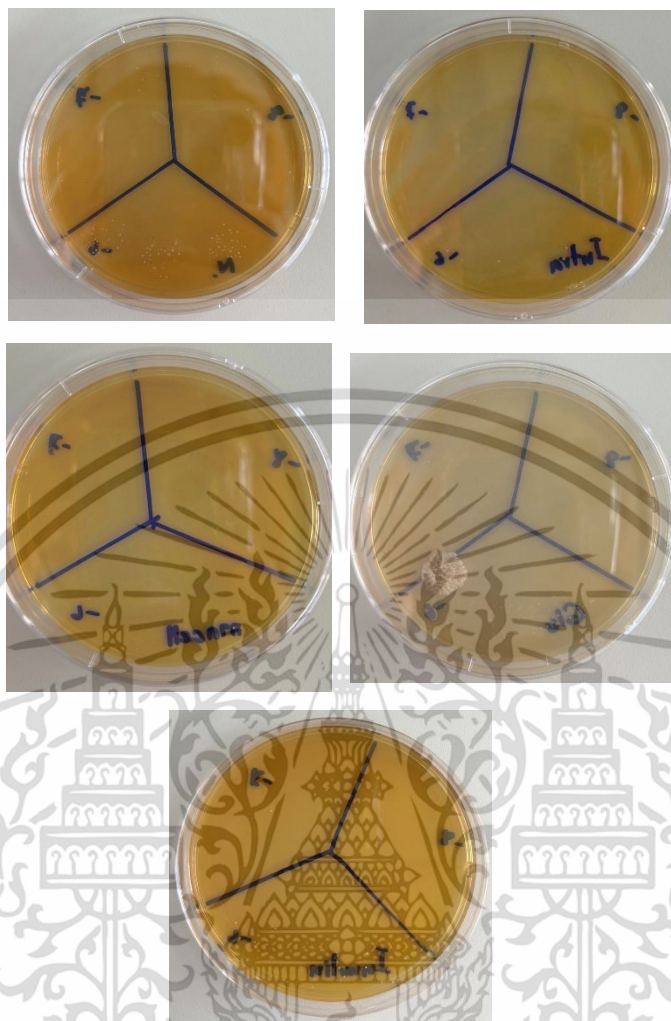
รูปที่ ง.8 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.๑ เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

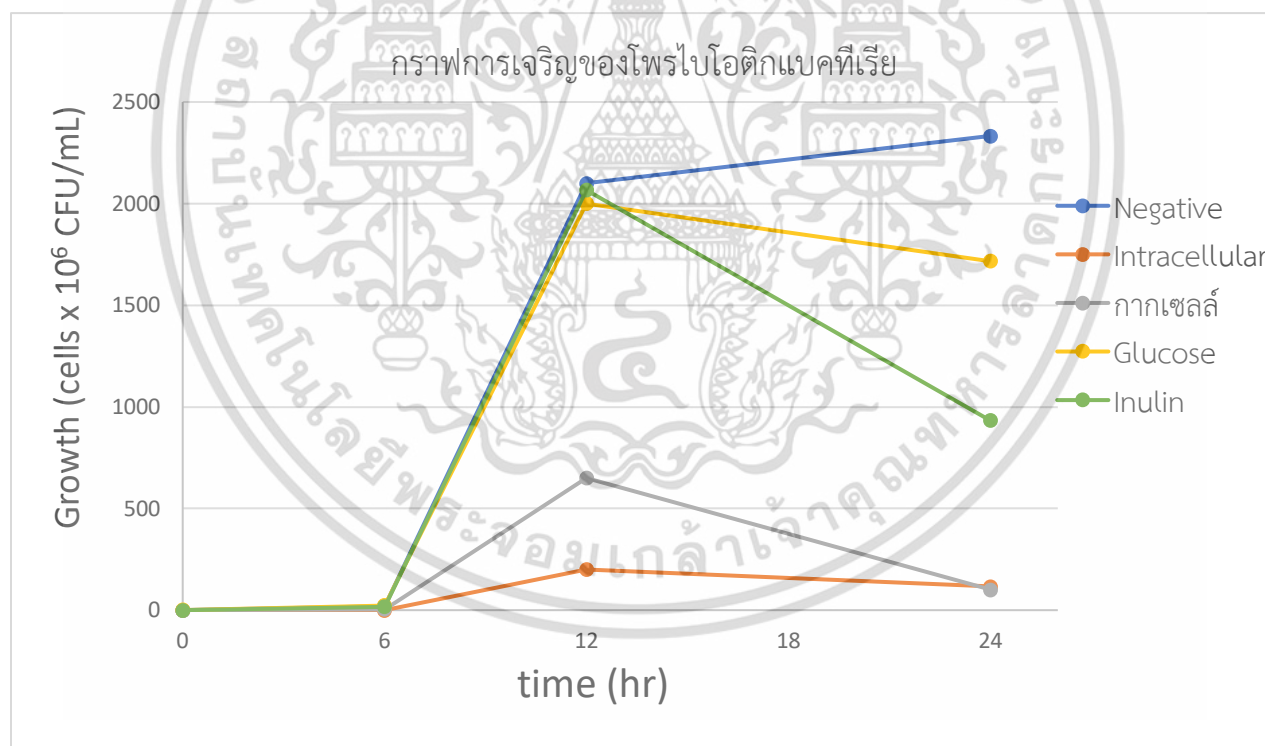


รูปที่ ง.10 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

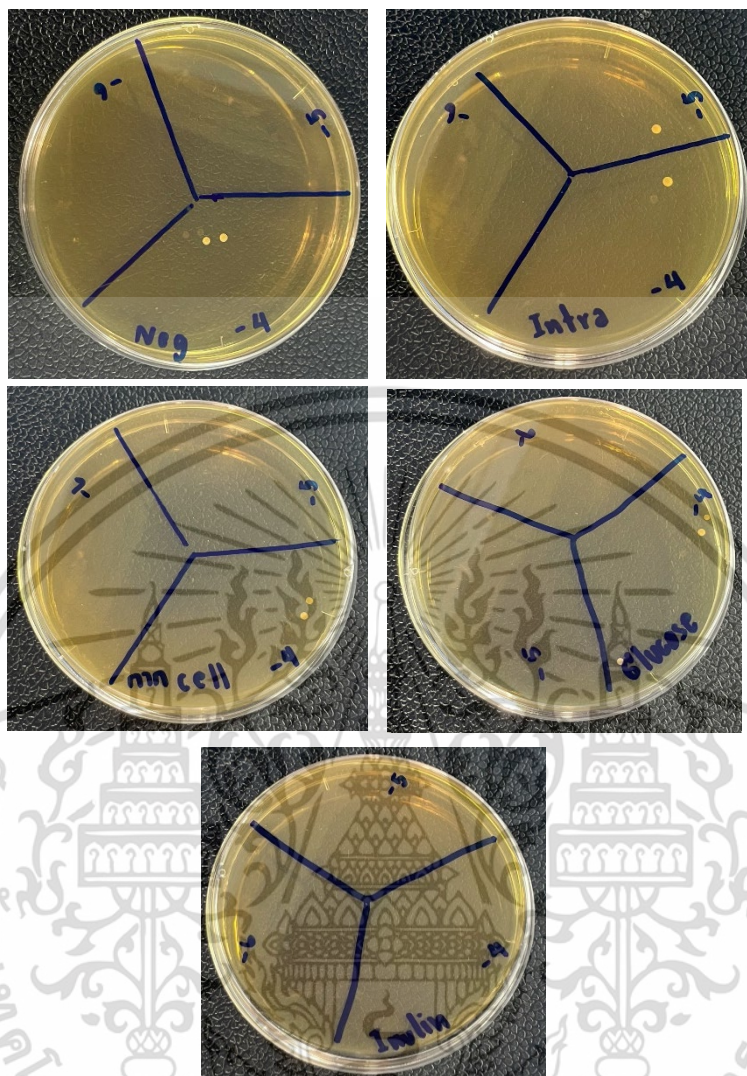
ตารางที่ ๕.5 จำนวนเซลล์ที่นับได้จากการดรอเพลทของสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) และ growth control เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ซ้ำที่ 2

ชั่วโมงที่	Growth control	สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2%(w/v)			
		Intracellular	กากเซลล์	Glucose	Inulin
0	0.33	0.25	0.33	0.5	0
6	20.83	0.17	5	23	16.67
12	2100	200	650	2000	2066.67
24	2333.33	116.67	116.67	1716.67	933.33



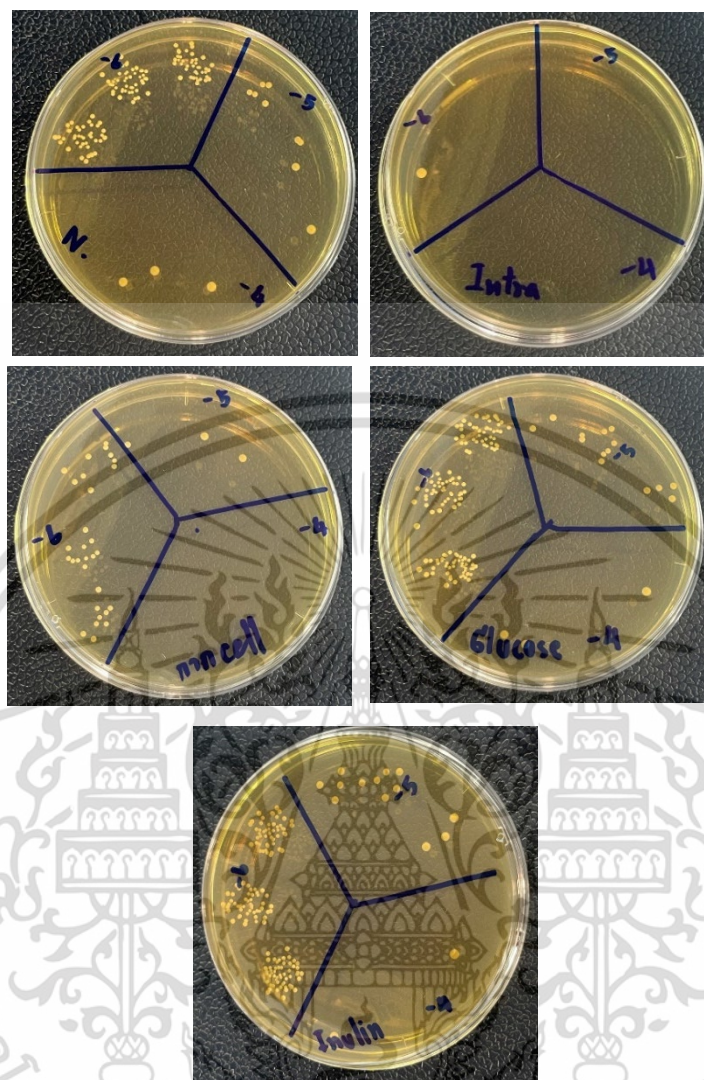
รูปที่ ๕.11 กราฟการเจริญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 หลังจากใส่สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



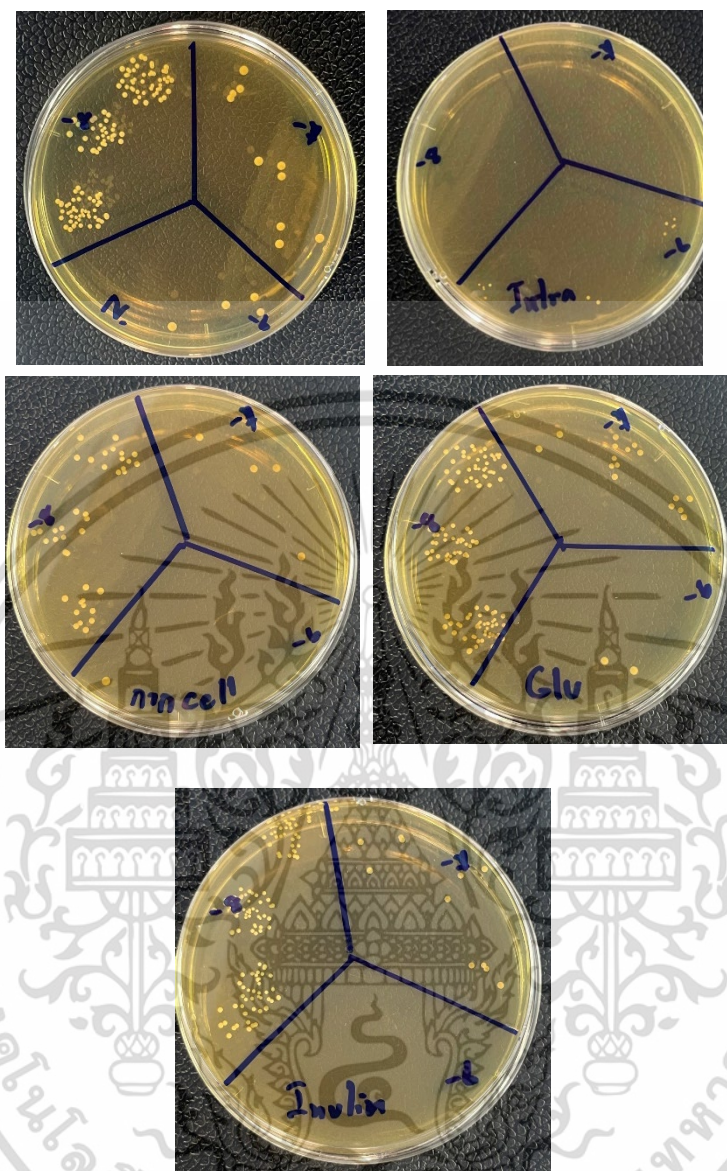
รูปที่ ง.12 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



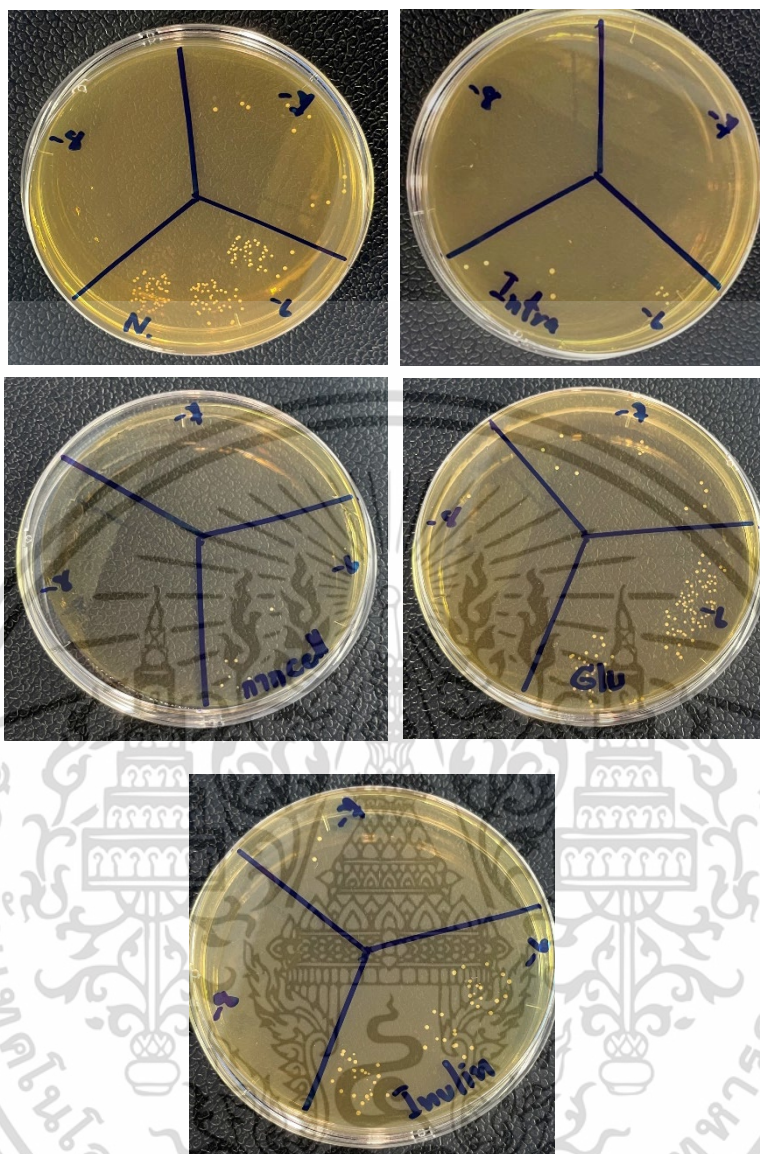
รูปที่ ง.13 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.14 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.15 เพลทที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้สารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ในชั่วโมงที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

## การวิเคราะห์ทางสถิติ

การส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 โดยใช้ Intracellular จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

H<sub>0</sub>: Intracellular ที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ความเข้มข้น 2% มีอัตราการส่งเสริมการเจริญ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ที่ไม่แตกต่างกัน

H<sub>1</sub>: Intracellular ที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ความเข้มข้น 2% มีอัตราการส่งเสริมการเจริญ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 ที่แตกต่างกัน

		count		
		Subset for alpha = 0.05		
solution	N	1	2	3
Duncan <sup>a</sup>	intracellular	3	200.0000	
	cell debris	3	650.0000	
	glucose	3		2000.0000
	inulin	3		2066.6667
	negative	3		2100.0000
	Sig.		1.000	1.000 .563

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ เดือน พ.ศ.

ข้าพเจ้า นางสาวเจตปริยา เอกอนงค์ รหัสประจำตัว 62050578

นายนิรันดร์ ทองทำกิจ รหัสประจำตัว 62050614

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การใช้สารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

ชื่อภาษาอังกฤษ Utilization of *Chlorella* sp. KLSc61 extract to promote the growth of *Lactobacillus plantarum* JCM 1149

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ ฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 4.05%

ลงชื่อ.....เจตปริยา เอกอนงค์..... ลงชื่อ.....นิรันดร์ ทองทำกิจ.....

(นางสาวเจตปริยา เอกอนงค์)

(นายนิรันดร์ ทองทำกิจ)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ ศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..........

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้