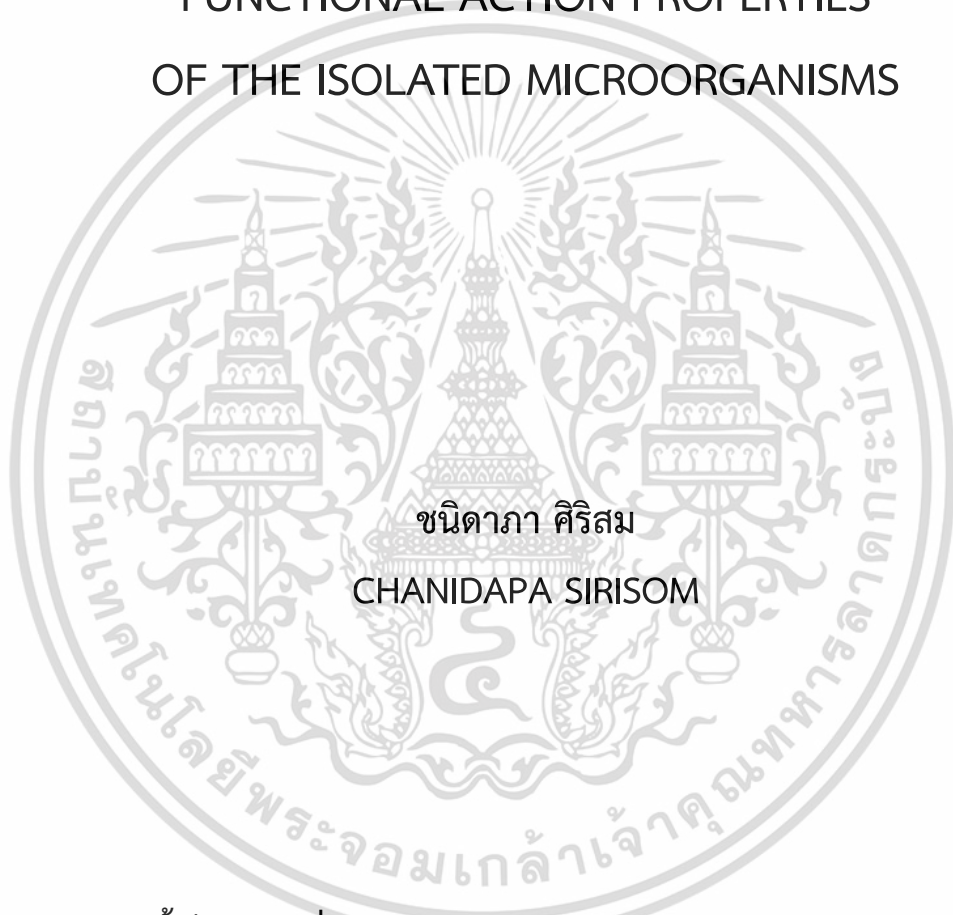


การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกและการออกฤทธิ์
เชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

THE STUDY OF PROBIOTIC PROPERTIES AND
FUNCTIONAL ACTION PROPERTIES
OF THE ISOLATED MICROORGANISMS



ชนิดาภา ศิริสม
CHANIDAPA SIRISOM

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE STUDY OF PROBIOTIC PROPERTIES AND
FUNCTIONAL ACTION PROPERTIES
OF THE ISOLATED MICROORGANISMS



A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงนวิชาหรบการเซงานเพอการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาดเหนาไปเซประเษนดานการค้ำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกรั้งห้ามมิให้ดัดแอสองเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2023

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกและการออกฤทธิ์เชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนิดาภา ศิริสม รหัสนักศึกษา 63050460
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. กวินชญา สายแก้ว

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก พืช ดิน และมูลสัตว์ ในจังหวัดน่าน ประเทศไทย โดยทำการตรวจสอบปลอดภัยที่มีต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความไวต่อยาปฏิชีวนะ การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA แล้วทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกด้านการทนต่อสภาวะคล้ายน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารที่มีความเป็นกรดและและเกลือแร่ ความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และการทดสอบการออกฤทธิ์เชิงหน้าที่ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase, α -amylase และ Pancreatic lipase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งและไขมัน พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น และกลม ไม่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง และไม่มีการถ่ายถอดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้สามารถจำแนกจุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้งหมด 4 สปีชีส์ (Species) ได้แก่ *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*, จำนวน 4 สายพันธุ์ *Limosilactobacillus fermentum* จำนวน 3 สายพันธุ์, *Pediococcus pentosaceus* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus hirae* จำนวน 2 สายพันธุ์ เชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะคล้ายน้ำย่อยที่มีความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและเกลือแร่ที่อยู่ในปริมาณร้อยละ 80 ขึ้นไป ผลการทดสอบความสามารถในการเกาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ คือ Caco-2 และ HT29 พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ทั้งสองชนิดในช่วงร้อยละ 53.33 ± 0.52 - 97.55 ± 0.09 และ 2.94 ± 0.41 - 96.67 ± 0.41 ตามลำดับ โพรไบโอติกสายพันธุ์ *Limosilactobacillus fermentum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) และ *Pediococcus pentosaceus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) และเมื่อทำการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ โดยทำการเอกซสารถอดส่วนประกอบของเชื้อ 3 ส่วน คือ ส่วนใส (Supernatant) เซลล์มีชีวิต (Live cell) และ เซลล์ที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาย (Heat killed) พบว่า ส่วนใส (Supernatant) ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้ง 10 ไอโซเลต มีร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase, α -amylase และ Pancreatic lipase ที่สูงกว่าเซลล์มีชีวิต (Live cell) และ เซลล์ตาย (Heat killed)

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก, โพรไบโอติก, α -glucosidase, α -amylase, Pancreatic lipase



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	THE STUDY OF PROBIOTIC PROPERTIES AND FUNCTIONAL ACTION PROPERTIES OF THE ISOLATED MICROORGANISMS
Students	Miss CHANIDAPA SIRISOM 63050460
Degree	Bachelor of Science (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Dr. Kawinchaya Saikaew

Abstract

The objective of this study was to study the probiotic properties and functional properties of microorganisms isolated from fermented food, plants, soil, and animal manure in Nan Province, Thailand. By examining the safety effects on red blood cell digestion, antibiotics susceptibility, classification of species by morphological characteristics and study of nucleotide sequences in the 16S rDNA region. The properties of the probiotics were then studied in terms of their tolerance to conditions similar to acidic gastrointestinal juice and bile salts. Ability to adhere to intestinal lining cells, testing for the inhibition of pathogenic microorganisms and testing of functional effects on enzyme activity α -glucosidase, α -amylase and Pancreatic lipase involved in the digestion of starch and lipid. It was found that 10 bacterial isolates were classified as lactic acid bacteria. The results of the study found that each isolate was a gram-positive bacterium. The shape is short rod and coccus. There is no digestion of red blood cells and there is no transmission of antibiotic resistance. When classifying microbial species a total of 4 probiotic species were identified: *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus hirae*. Each isolate exhibited approximately 80% survival ability in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the acidic environment of the stomach and in the presence of bile salts. Results of tests on their ability to adhere to intestinal mucosa cells, specifically Caco-2 and HT29, indicated that the microorganisms demonstrated adhesion abilities to both types of intestinal mucosa cells, ranging from 53.33 ± 0.52 - 97.55 ± 0.09 and 2.94 ± 0.41 - 96.67 ± 0.41 respectively. Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* has the effect of inhibiting 1 strain of pathogenic microorganisms, namely *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Pediococcus pentosaceus* it has the effect of inhibiting 1 strain of pathogenic microorganisms, namely *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). And when studying enzyme inhibition by testing the components of 3 factions of the bacteria namely the supernatant, live cells and heat killed, it was found that the supernatant of all 10 probiotic microorganism isolates had a percentage of enzyme inhibition α -glucosidase, α -amylase and Pancreatic lipase that are higher than live cells and heat killed.

Keywords : Lactic acid bacteria, Probiotic, α -glucosidase, α -amylase, Pancreatic lipase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

หัวข้อสหกิจศึกษานี้ที่ได้รับมอบหมายเป็นการศึกษาวิจัยเรื่อง การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ สามารถดำเนินการจนประสบความสำเร็จจลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ในการสนับสนุนให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการศึกษาค้นคว้า ตลอดจนแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่าง ๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. จารุวรรณ สิทธิพล นักวิจัยอาวุโส ที่กรุณาให้โอกาสในการเข้ามาทำสหกิจศึกษาที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่าง ๆ ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร. ขนิษฐา นิวาตะบุตร นักวิจัย ที่ให้ความรู้เทคนิคการทดสอบเอ็นไซม์หลักการทำงาน และให้คำปรึกษาในระหว่างที่ปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณ นางสาวหนึ่งนุช ไชยวรรณ นักทดลองวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความรู้ในด้านเทคนิคทางจุลชีววิทยา การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เทคนิคการทำ PCR, Gel electrophoresis การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก คอยให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่าง ๆ ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษาและช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณ นางสาวกมลศรี นวลคำ ผู้ช่วยนักวิจัย ผู้ให้คำแนะนำในเทคนิคการทำ Purified และการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit

ขอขอบพระคุณ นางสาวณัฐริการ์ นวลศรี ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ให้ความรู้ในด้านเทคนิคทางจุลชีววิทยา การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษาและช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณ ดร. กวินชญา สายแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ที่คอยให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่าง ๆ ให้ความถูกต้องและสมบูรณ์ ตลอดการทำสหกิจศึกษา

ขอขอบพระคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์นิเทศสหกิจศึกษา ที่คอยให้คำปรึกษา ติดตามการทำงาน และดูแลความเรียบร้อยในระหว่างการศึกษา

ชนิดาภา ศิริสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อหา

บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โพรไบโอติก	3
2.2 คุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก.....	3
2.2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์โพรไบโอติก	3
2.2.2 ความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ (Bile salt Tolerant).....	4
2.2.3 การทดสอบการเกาะติดเซลล์เยื่อบุลำไส้	4
2.2.4 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค.....	4
2.2.5 การยับยั้งเอนไซม์	5
2.3 การศึกษาความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติก	5
2.3.1 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	5
2.3.2 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ.....	6
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	8

เอกสารนี้เป็นเครื่องมือที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์.....	8
สารเคมี.....	10
อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	12
ขั้นตอนการทดสอบ.....	12
3.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์	12
3.2 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	12
3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเซลล์.....	13
3.3.3 การทดสอบการทนกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดี	13
3.3.4 การทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้	14
3.3.5 การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์.....	15
3.3.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	17
3.3.7 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง.....	18
3.3.9 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme Activity Assay).....	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	28
4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์.....	28
4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา.....	29
4.2 การทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นของจุลินทรีย์โพรไบโอติก	29
4.2.1 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolysis).....	29
4.2.2 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic suscepibility).....	31
4.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก	32
4.3.1 การทดสอบการทนกรดและทนต่อเกลือน้ำดี (Bile-Salt Resistance).....	32
4.3.2 การทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Adhesion Test).....	33
4.3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์	34
4.3.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค.....	35
4.3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ α - Glucosidase.....	36
4.3.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ α -Amylase.....	37
4.3.7 การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ Pancreatic Lipase.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำมาเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่ากรณีนี้

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	42
5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก ก	49
ภาคผนวก ข	51
ภาคผนวก ค	58
ภาคผนวก ง	62



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.3.5 ส่วนประกอบของสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร	16
3.3.6 ค่ามาตรฐานสำหรับการอ่านผลความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียและยีสต์	18
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ	28
4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, การทดสอบคะตาเลส และผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง .	30
4.2.2 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	32
4.3.1 การอยู่รอดของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในสภาวะคล้ายน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารที่เป็นกรดและเกลือแร่ และความสามารถในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้.....	33
4.3.3 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	35
4.3.4 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค AGAR WELL DIFFUSION.....	36
4.3.5. การยับยั้งเอนไซม์ ALPHA-GLUCOSIDASE ของ โพรไบโอติก และ ACARBOSE.....	37
4.3.6 การยับยั้งเอนไซม์ ALPHA - AMYLASE ของโพรไบโอติก และ ACARBOSE.....	38
4.3.7 การยับยั้งเอนไซม์ PANCREATIC LIPASE ของโพรไบโอติกและ ORLISTAT.....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
BHI	Brain Heart Infusion
CBA	Colombia Blood Agar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
LAB	Lactic Acid Bacteria
MHB	Mueller HintonBroth
MRS	De Man–Rogosa–Sharpe broth
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer solution
TSB	Tryptic Soy Broth
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันปัญหาด้านสุขภาพของคนไทยเกิดจากพฤติกรรมการบริโภค และพฤติกรรมการใช้ชีวิต ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคอ้วน โรคคอเรสเทอรอลสูง โรคมะเร็ง และปัญหาต่างๆในระบบทางเดินอาหาร ระบบย่อยอาหาร ไปจนถึงระบบขับถ่าย การใช้โพรไบโอติกในการเป็นอาหารเสริมทางเลือกใหม่เป็นที่นิยม และรู้จักกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เหมาะสำหรับ กระบวนการอุตสาหกรรม สามารถทนกรด ทนน้ำดี และผลิตสารต้านจุลชีพ (Mojsani *et al.*, 2015) และนอกจากนี้โพรไบโอติกยังมีประโยชน์ทางด้านระบบทางเดินอาหาร ระบบขับถ่าย และการเพิ่มการดูดซึม สารอาหาร การลดระดับคอเรสเทอรอลในเลือด ลดความเสี่ยงของโรคท้องร่วงและมะเร็งบางชนิด (Nami *et al.*, 2022) โดยทั่วไปโพรไบโอติกจะอยู่ในรูปของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในลำไส้และอาหารหมักต่างๆ เช่น ผักดอง ซีส โยเกิร์ต เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ รวมไปถึงแหล่งธรรมชาติต่างๆ เช่น ดิน พีช และมูลสัตว์ ซึ่ง คุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่ดีคือต้องมีความทนต่อค่า pH ที่ต่ำและเกลือน้ำดีเพื่อให้สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารได้ และต้องมีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และลักษณะสำคัญอื่น ๆ ที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้สายพันธุ์โพรไบโอติก ได้แก่ ความไวต่อยาปฏิชีวนะ การย่อยเม็ดเลือดแดง เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (Saarela *et al.*, 2000) ด้วยคุณสมบัติที่มีประโยชน์ตามรายงานข้างต้น โพรไบโอติกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษา เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในด้านการอยู่รอดในสภาวะไร้อากาศ การทนต่อกรดใน กระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ ความสามารถในการยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในทางเดินอาหารได้ รวมไปถึงและการทดสอบการออกฤทธิ์เชิงหน้าที่ ที่มีผลต่อการ ทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase, α -amylase และ Pancreatic lipase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งและ ไขมัน

การศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เพื่อทำการศึกษาต่อในการเสริมสุขภาพในด้านการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติกจากอาหารหมัก ดิน พีช และมูลสัตว์
- 2) เพื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้
- 3) เพื่อทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) คัดแยกและรวบรวมแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหล่งธรรมชาติ และอาหารหมักในจังหวัดน่าน ประเทศไทย
- 2) ทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงวิธีการคัดแยกแบคทีเรียและการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
- 2) สามารถจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โพรไบโอติก

โพรไบโอติกมาจากคำภาษากรีกว่า “Probios” ซึ่งหมายถึง "การมีชีวิต" ซึ่งตรงข้ามกับคำว่า "Antibiotic" ซึ่งหมายถึง "ต่อต้านการมีชีวิต" (Das et al., 2022) ตามรายงานของ Food and Organisation (2001) กล่าวว่า “โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพต่อร่างกาย” (Macho Fernandez et al., 2011) ต่อมาในเดือนตุลาคม 2556 สมาคมวิทยาศาสตร์ระหว่างประเทศด้านชีวภาพ (International Scientific Association) ได้ก่อตั้งคณะกรรมการที่ปรึกษา เพื่อปรับแนวคิดเกี่ยวกับโพรไบโอติก โดยปรับปรุงคำจำกัดความของ FAO/WHO (Rashmi & Gayathri, 2017) ให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ประโยชน์มีการปรับเปลี่ยนนิยามเล็กน้อยและกำหนดให้เป็น ‘จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งให้ประโยชน์ต่อสุขภาพแก่โฮสต์เมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม’ (Hill et al., 2014) ผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิดเป็นแหล่งที่อยู่สำคัญของโพรไบโอติก นอกจากนี้ยังมีโพรไบโอติกที่เป็นสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกที่สามารถหาได้จากแหล่งต่างๆ เช่น นมแม่ ถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ตดิบ รวมไปถึงโกลี-โกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากพืช (Saarela et al., 2000) ปัจจุบัน โพรไบโอติก ได้รับการยอมรับว่าเป็นส่วนผสมอาหารที่ส่งเสริมสุขภาพหลายประการ โพรไบโอติกจึงเป็นจุลินทรีย์ที่ทั่วโลกให้ความสนใจเพื่อให้ได้รับการสำรวจว่าเป็นการบำบัดทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการรักษาความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมต่างๆ (Oniszczuk et al., 2021) เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เหมาะสำหรับกระบวนการอุตสาหกรรม สามารถทนกรด ทนน้ำดี และผลิิตสารต้านจุลชีพได้ (Mojgani et al., 2015)

2.2 คุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

2.2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

รูปร่างเซลล์ของโพรไบโอติกมีหลากหลายรูปแบบโดยเซลล์จะมีรูปร่าง กลม (Cocci) และรูปท่อน (Bacillus) ผนังเซลล์ย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหุ้มห่อติดสีคริสตัลไวโอเลตได้ดีและเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสีคริสตัลไวโอเลตกลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (crystal violet-iodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย ethyl alcohol 95% ขั้นตอนนี้ แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูปร่างเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ ตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อย ผลึกของสียังคงติดแน่นอยู่ (คริสตัลไวโอเลตสีน้ำเงินหรือม่วง) ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน (สีแดง) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบซึ่งเดิมไม่ติดสีจะติดสีแดงในขั้นตอนนี้จึงเห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มอย่างชัดเจน (Moyes et al., 2009) สามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

2.2.2 ความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ (Bile salt Tolerant)

เนื่องจากว่าโพรไบโอติกถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในด้านอาหารเสริมและการใช้โพรไบโอติกคือการนำไปบริโภคเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะต้องผ่านระบบทางเดินอาหาร ตั้งแต่ปาก คอหอย กระเพาะอาหาร ไปจนถึงลำไส้เล็ก จุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงมีความจำเป็นต้องมีความสามารถในการอยู่รอดในกระเพาะอาหารที่มีค่า pH ต่ำและเกลือแร่ที่มีความเข้มข้นสูง (Kobierecka et al., 2017) เนื่องจากเกลือแร่ที่ส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (ผุสตี, จิโรจน์ และ กานต์. 2559) และความทนทานต่อกรดของแบคทีเรียในกระเพาะอาหารยังเป็นข้อกำหนดเบื้องต้นสำหรับการใช้เป็นอาหารเสริม และช่วยให้ โพรไบโอติกสามารถอยู่รอดได้ในระยะเวลาสั้นขึ้นในอาหารที่มีกรดสูง

2.2.3 การทดสอบการเกาะติดเซลล์เยื่อบุลำไส้

การยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุลำไส้ของโพรไบโอติกมีความสำคัญเนื่องจากช่วยป้องกันการบุกรุก และการสร้างสารพิษของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และยังมีรายงานว่า การเกาะติดและการเพิ่มจำนวนของโพรไบโอติกในลำไส้เป็นผลทางสรีรวิทยาซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญของคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก การเกาะติดของโพรไบโอติกช่วยรักษาสมดุลโครงสร้างของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ให้เป็นปกติ รักษาความสมบูรณ์ทางสัณฐานวิทยาและการทำงานของเยื่อเมือกในลำไส้และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อโรคในลำไส้ (Juge, 2012) กลไกในการช่วยยึดเกาะลำไส้ของโพรไบโอติกเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างไขมันและเพปทิโดไกลแคน และโปรตีนบนพื้นผิวที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเชื่อมโยงองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน ช่วยให้เกิดการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Singh et al., 2017)

2.2.4 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ตามรายงานของ (Divyashree et al., 2021) กล่าวว่ากิจกรรมนี้อาจเกิดจากการมีสารประกอบที่ต้านจุลชีพ เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ผลิตโดยเชื้อโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ กลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกมีหลากหลาย เช่น การผลิตสารยับยั้ง คือ แบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ (Kanmani et al., 2013) มีโพรไบโอติกหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค Sikorska & Smoragiewicz, (2013) กล่าวว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium Acnes*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lactobacillus fermentus* ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ทนต่อ methicillin อาจเกิดจากการผลิตกรดหรือสารยับยั้งแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 การยับยั้งเอนไซม์

α -Glucosidase และ α -Amylase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยแป้ง และคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในผู้ป่วยโรคเบาหวานการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -Glucosidase ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้ (ภัทรา และ นาฏศจี. 2556) โดยโมเลกุลขนาดใหญ่ของคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในอาหารจะถูกไฮโดรไลซิสในขั้นแรกด้วย α -amylase ซึ่งพบได้ทั้งในน้ำลายและตับอ่อน ให้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือไดแซ็กคาไรด์ที่มีขนาดเล็กลงโดยมีพันธะ D-glycosidic จากนั้นโมเลกุลเหล่านี้จะถูกย่อยสลายเพิ่มเติมโดย α -glucosidase ที่ขนาดเล็กๆรอบๆของเซลล์ที่อยู่ในลำไส้เล็กเพื่อผลิตกลูโคส ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น (Ren et al., 2023)

(Chen et al., 2014) มีการทดสอบว่า Cell free Supernatant ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* Z7, *Bifidobacterium bifidum* F-35, *Lactobacillus casei* 2W และ *Lactobacillus bulgaricus* L24 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง α -Glucosidase ที่มีศักยภาพมาก

Pancreatic Lipase เป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยตับอ่อนที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยและการดูดซึมไขมันในอาหาร หน้าที่ของเอนไซม์ Pancreatic Lipase คือสลายไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นไขมันประเภทหนึ่งให้กลายเป็นกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของโมโนกลีเซอไรด์ ทำให้เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอ้วน Tetrahydrolipostatin (Orlistat / Xenical) เป็นตัวยับยั้งไลเปสเพียงตัวเดียวที่ได้รับการอนุมัติจาก FDA สำหรับการรักษาโรคอ้วนที่ออกฤทธิ์ผ่านการมีปฏิกิริยาที่ไม่สามารถย้อนกลับได้กับสารตกค้าง Asp176, His263 และ Ser152 ของบริเวณที่ทำงานของเอนไซม์ แต่การใช้ Orlistat ก็มีผลข้างเคียงที่ร้ายแรงบางประการ รวมถึงการดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมัน อุดจากระที่มีไขมัน ท้องอืด ท้องเสียฉับพลัน และปวดท้อง (Aydin & Onbasi, 2021) จึงมีการศึกษาใช้โพรไบโอติก ในการยับยั้งเอนไซม์ Pancreatic Lipase แทนการใช้ Orlistat

2.3 การศึกษาความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

2.3.1 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

การย่อยเม็ดเลือดแดงมีทั้งหมด 3 ลักษณะคือ คือ β -hemolysis คือย่อยสลายแบบสมบูรณ์ ซึ่งจะพบ clear zone ในรอบๆรอยขีด, α -hemolysis คือการย่อยสลายบางส่วน มีสีเขียวรอบๆรอยขีด และ γ -hemolysis คือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (Wang et al., 2016) โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงให้แตกคือ เป็นลักษณะ γ -hemolysis (ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

สำหรับแบคทีเรียทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะตามที (Hazards, 2012) ระบุให้เชื้อที่จะนำไปใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกต้องทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด คือ Ampicillin (AMP), Chloramphenicol (C), Gentamycin (GN), Clindamycin (DA), Erythromycin (E), Kanamycin (K), Streptomycin (S), Tetracycline (TE) และ Vancomycin (VA) จากข้อมูลการศึกษามีการรายงานไว้ว่าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกคือต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin แบบ Intrinsic factors คือจะไม่สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยานี้ให้กับเชื้อจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากกลไกการทำงานของ Vancomycin ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นโดยยาจะเข้าไปจับกับกรดอะมิโน D-alanine ที่ตำแหน่งปลายของสายของ muramyl pentapeptide ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในโครงสร้างของ peptidoglycan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้เพราะไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ให้สมบูรณ์ได้ ซึ่ง Delcour *et al.*, 1999 รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ จีโนส (Genus) *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococci* และ *Lactobacillus* จะมีการแทนที่ กรดอะมิโน D-alanine ด้วย D-lactate หรือ D-serine จึงทำให้ Vancomycin ไม่สามารถเข้าจับได้ ส่งผลให้แบคทีเรียในจีโนสดังกล่าว เกิดการดื้อต่อ Vancomycin

ส่วนการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides (Kanamycin, Neomycin, Gentamicin และ Streptomycin) ได้รับการพิจารณาว่าเป็นการดื้อยา แบบ Intrinsic factor เพราะแบคทีเรียไม่มีสารตัวกลาง cytochrome mediated electron transport ที่จะดูดซึมตัวยากลุ่มนี้เข้าสู่วงจรการเจริญของเซลล์ (Charteris *et al.*, 2001; Danielsen and Wind, 2003) ดังนั้นแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยา Gentamicin (GN), Kanamycin (K), Streptomycin (S) และ Vancomycin (VA) จึงสามารถนำไปใช้ทดสอบเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในขั้นต่อไปได้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภูมิใจ และ คณะ (2566) ทำการศึกษาคุณลักษณะของคุณสมบัติโพรไบโอติกที่แยกได้จากกล้วยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกล้วยต่อโดยการทำให้แห้งและแบบแช่แข็งจากการศึกษาพบว่า *L. paracasei* มีคุณสมบัติที่เป็นโพรไบโอติกในการเอาอยู่รอดจากสภาวะความเครียดในระบบทางเดินอาหารและความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคลำไส้ นอกจากนี้ยังปลอดภัยในการใช้และแสดงคุณสมบัติในความไวต่อยาปฏิชีวนะอีกด้วย

Dong *et al.*, (2023) ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 7 สายพันธุ์จากผลิตภัณฑ์นมหมักแบบดั้งเดิมในมองโกเลีย ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติก 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* 3 สายพันธุ์, *Pediococcus pentosaceus* 1 สายพันธุ์, *Lactocaseibacillus paracasei* 2 สายพันธุ์ และ *Pediococcus acidilactici* 1 สายพันธุ์ และทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* (M-518), *Aspergillus flavus* (CICC 2031), *Aspergillus parasiticus* (CICC) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2175), *Talaromyces rubrifaciens* (LRS-407), *Penicillium Roqueforti* (M-517), *Penicillium citrinum* (M-519), *Mucor niemalis* (CICC 40868), *Zygosaccharomyces rouxii* (LJL117) และ *Rhodotorula glutinis* (CICC 33037), *Candida albicans* (CICC 32819) จากการศึกษาพบว่า Cell free Supernatant ของ *Lactocaseibacillus paracasei* ให้ผลการยับยั้งที่มีนัยยะสำคัญต่อยีสต์ *C. albicans* และเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus*

F. Kouhi et al., (2022) ทำการศึกษาศักยภาพและความปลอดภัยของโพรไบโอติกโดยทำการแยกโพรไบโอติกจากชีส Motal ทั้งหมด 52 ไอโซเลท พบว่า 10 ไอโซเลทมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก คือสามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือ น้ำดี จึงทำการทดสอบขั้นต่อไป คือกาทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ จากผลการทดสอบ เชื้อที่ผ่านการทดสอบ 6 ใน 10 ไอโซเลท ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus avium* และ *Enterococcus durans* ไม่ได้แสดงให้เห็นถึงการย่อยเม็ดเลือดแดง หรือการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ศึกษา และทั้ง 6 ไอโซเลท ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* และมีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ได้ดี

Kim et al., (2018) ทำการทดสอบศักยภาพของ *Lactobacillus plantarum* K10 พบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง α -amylase ถึง $94.66 \pm 4.88\%$ และมีความสามารถในการยับยั้ง pancreatic lipase ได้ถึง $87.40 \pm 1.41\%$ การยับยั้ง pancreatic lipase มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคอ้วนเนื่องจากการยับยั้งการดูดซึมไขมันในลำไส้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือ

- 3.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical Balances) (OHAUS, USA)
- 3.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ (Mettler, Germany)
- 3.1.3 ตู้นิรภัย (Biosafety Cabinet) (Mettler, Germany)
- 3.1.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Mettler, Germany)
- 3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Mikro Hettich zentrifugen, Thailand)
- 3.1.6 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Microscope)
- 3.1.7 เครื่องไมโครเวฟ (TOSHIBA, Japan)
- 3.1.8 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
- 3.1.9 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
- 3.1.10 เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Hot plate stirrer) (LABTron, Korea)
- 3.1.11 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- 3.1.12 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Mettler, Germany)
- 3.1.13 เครื่องถ่ายภาพเจล (UVTECH Cambridge ALLIANCE, UK)
- 3.1.14 เครื่องวัดปริมาณกรดนิวคลีอิก (Thermo Scientific Nanodrop 2000C, USA)
- 3.1.15 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo cycler) (Biometra TP Professional Thermocycler, Germany)
- 3.1.16 เครื่องแยกสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์ด้วยไฟฟ้า (Gel Electrophoresis) (ENDURO Gel XL, USA)
- 3.1.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (Mettler, Germany)
- 3.1.18 เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
- 3.1.19 เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating block) (Boekel Scientific, USA)
- 3.1.20 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.1.21 เครื่องอ่านผลไมโครเพลท (Microplate reader)
- 3.1.22 กล้องจุลทรรศน์สำหรับเซลล์ไลน์ (Microscope for cell line)
- 3.1.23 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope) (Olympus, Japan)

อุปกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

- 3.1.24 เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.25 Petri dish (Plate) ขนาดปกติ (9 เซนติเมตร)
- 3.1.26 Auto Pipette ขนาด ต่าง ๆ
- 3.1.27 ทิป ขนาด ต่าง ๆ
- 3.1.28 ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.1.29 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- 3.1.30 แผ่นสไลด์
- 3.1.31 กระบอกฉีดยา (Syring) ขนาด 20 มิลลิลิตร
- 3.1.32 หัวกรอง (Filter) ขนาด 0.2 ไมครอน
- 3.1.33 ซ้อนตักสารพลาสติก
- 3.1.34 ถ้วยซั่งสาร
- 3.1.35 หลอด Microcentrifuge tube 2 มิลลิลิตร
- 3.1.36 หลอด Microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.37 หลอด Microcentrifuge tube 0.5 มิลลิลิตร
- 3.1.38 หลอด DFH Column
- 3.1.39 หลอด Collection Tube
- 3.1.40 หลอด Centrifuge 15 มิลลิลิตร
- 3.1.41 หลอด Centrifuge 50 มิลลิลิตร
- 3.1.42 Micro well plate 24 well
- 3.1.43 ½ Micro well plate 96 well flat white
- 3.1.44 ½ Micro well plate 96 well flat black
- 3.1.45 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.46 คีมคีบสแตนเลส (Forceps)
- 3.1.47 ที่เจาะรูวุ้น (Cork borer) เบอร์ 3
- 3.1.48 ไม้พันสำลี (Cotton swab)
- 3.1.49 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- 3.1.50 T flask cell culture
- 3.1.51 ปิเปตพลาสติก
- 3.1.52 หลอด 4 แตรม
- 3.1.53 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.1.54 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic stirring bars)
- 3.1.55 หลอดดูดพลาสติก (Transfer pipette)
- 3.1.56 Anaerobic box
- 3.1.57 Anaerobic cultivation bag

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นได้ขออนุญาตและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.58 Anaerobic pack ขนาด 2.5 ลิตร

3.1.59 Anaerobic pack ขนาด 3.5 ลิตร

3.1.60 ไม้จิ้มฟัน

สารเคมี

3.1.61 Glyceral (Merck, Germany)

3.1.62 Tween 80 (Merck, Germany)

3.1.63 Triton X100 (Merck, Germany)

3.1.64 Sodium Chloride (Supelco EMSURE, Germany)

3.1.65 L- cysteine hydrochloride monohydrate (Himedia, India)

3.1.66 Alcohol 95% (กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

3.1.67 Gram Iodine (Merck, Germany)

3.1.68 Safranin (Merck, Germany)

3.1.69 Crystal violet (Merck, Germany)

3.1.70 Immersion oil (Merck, Germany)

3.1.71 Distilled water (Merck, Germany)

3.1.72 Calcium carbornate (CaCO_3) (Himedia, India)

3.1.73 Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) (UNIVAR, Germany)

3.1.74 Disodium phosphate (Na_2HPO_4) (Merck, Germany)

3.1.75 Potassium chloride (KCl) (UNIVAR, Germany)

3.1.76 McFarland No.1 (Himedia, India)

3.1.77 Hydrochloric (HCl) (Merck, Germany)

3.1.78 Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)

3.1.79 Bile salt (Sigma, Austria)

3.1.80 Pepsin (Sigma, Austria)

3.1.81 Agar (Merck, Germany)

3.1.82 Penicillin (Oxoid, UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.1.83 Chloramphenicol (Oxoid, UK)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.84 Clindamycin (Oxoid, UK)
- 3.1.85 Gentamicin (Oxoid, UK)
- 3.1.86 Tetracycline (Oxoid, UK)
- 3.1.87 Kanamycin (Oxoid, UK)
- 3.1.88 Vancomycin (Oxoid, UK)
- 3.1.89 Erythromycin (Oxoid, UK)
- 3.1.90 Streptomycin (Oxoid, UK)
- 3.1.91 3 % Hydrogen peroxide (H₂O₂) (Merck, Germany)
- 3.1.92 TE buffer
- 3.1.93 L- Cysteine (Merck, Germany)
- 3.1.94 TAE buffer (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.95 Tag DNA polymerase (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.96 Distilled water (dH₂O)
- 3.1.97 Gel star (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.98 6x Loading dye (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.99 DNA Template (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.100 Primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 27F และ 1492R
- 3.1.101 0.8 % Agarose gel
- 3.1.102 DNA Marker 1000 kbp (Kilo base pair) (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.103 Purification kit ประกอบด้วย PCR Gel Buffer, Wash buffer และ Elution GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Taiwan)
- 3.1.104 Enzyme Yeast α-glucosidase (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.105 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.106 Acarbose Standard (Sigma, Austria)
- 3.1.107 Tris-HCl Buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 3.1.108 Pancreatic lipase (type II, from porcine pancreas) (Sigma, Austria)
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.109 4-Methyl Umbelliferyl Oleate
- 3.1.110 Orlistat Standard
- 3.1.111 HEPES Buffer
- 3.1.112 Enzyme α -Amylase from Porcine Pancreas
- 3.1.113 4-nitrophenyl α -D-maltohexaside

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.114 De Man–Rogosa–Sharpe broth (MRS) (Himedia, India)
- 3.1.115 Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, USA)
- 3.1.116 Columbia Blood Agar Base (CBA) (Difco, USA)
- 3.1.117 Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Himedia, India)
- 3.1.118 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cytiva, USA)

ขั้นตอนการทดสอบ

3.1 การเก็บตัวอย่างและการตัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเก็บตัวอย่างจากดิน มูลสัตว์ และพืช ในจังหวัดน่าน ประเทศไทย นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงทำการเก็บเชื้อลงใน 20% กลีเซอรอล และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อที่เก็บใน 20% กลีเซอรอล มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L-cysteine hydrochloride monohydrate เพื่อทำการไล่อากาศ ทำการปิเปตเชื้อ 200 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate 10 มิลลิลิตร และทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate 50 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิค Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเซลล์

3.3.1 ทดสอบการติดสีแกรม (Gram's strain)

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์เกลี่ยลงแผ่นสไลด์ รอให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วนำสไลด์ผ่านไฟเพื่อทำการตรึงเซลล์ หลังจากนั้น หยดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอย Smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสารละลายแกรมไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง หยดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เพื่อล้างสี แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นทันที เมื่อล้างออกด้วยน้ำกลั่นแล้วหยดสีซาฟรานินโอ ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น รอจนแห้งแล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะมิลเลส

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% H_2O_2) ลงแผ่นสไลด์ นำลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์เสมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วตรวจผลโดยการสังเกตการเกิดฟองแก๊ส หากเกิดฟองแก๊สแสดงว่าแบคทีเรียที่ทดสอบ มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และถ้าหากไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าแบคทีเรียที่ทดสอบไม่มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.3.3 การทดสอบการทนกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดี

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อทดสอบ

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ และปรับความเข้มข้นของเชื้อให้อยู่ที่ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร

3.3.3.1 การทดสอบความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว ปีเปตลงอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate ทำการปรับ pH 2 ก่อนใช้งานเติม 0.1% pepsin และทดสอบ การอยู่รอดที่เวลา 0, 90 และ 180 นาที โดยการทำการเจือจาง 10 เท่า (10^{-1} - 10^{-7}) และนับเชื้อด้วยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS หลังจากนั้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ เมื่อครบเวลา ทำการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น ตามสมการดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ การรอดชีวิต} = \frac{\log \text{จำนวนเซลล์ที่เวลาต่างๆ}}{\log \text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.3.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี

นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเหลว MRS ปีเปตลงอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate ทำการปรับ pH 8 ก่อนใช้งานเติม 0.3% bile salt และทดสอบการอยู่รอดที่เวลา 0 , 90 และ 180 นาที โดยการทำการเจือจาง 10 เท่า (10^{-1} - 10^{-7}) และนับเชื้อด้วยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ เมื่อครบเวลา ทำการนับจำนวนเซลล์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ การรอดชีวิต} = \frac{\log \text{จำนวนเซลล์ที่เวลาต่างๆ}}{\log \text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}} \times 100$$

ในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี จะคัดเลือกเอาเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีค่าการรอดชีวิตตั้งแต่ 80% ขึ้นไป เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.3.4 การทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้

1. ขั้นตอนการเลี้ยง Caco-2 cell และ HT29

เลี้ยง Caco-2 / HT29 cell ใน T flask culture ด้วยอาหาร Complete media (Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin และ Streptomycin เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3-7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน

2. ขั้นตอนการ Seed cell

นำเซลล์ที่เลี้ยง ปรับความขุ่นให้ได้ 1×10^5 เซลล์/หลุม แล้ว เพาะเลี้ยงเซลล์ ลง micro well plate 24 หลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3-7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมเชื้อทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate 10 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ ปรับความเข้มข้นของเชื้อทดสอบให้ได้ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิกรัม ปิเปตเชื้อ 10 มิลลิกรัมในหลอด centrifuge และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) 3 รอบ แล้วละลายกลับด้วย Incompleted media (Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM) 10 มิลลิกรัม

4. ขั้นตอนการทดสอบ

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ Caco-2 / HT29 ให้เป็น Incompleted media 2 มิลลิกรัมต่อหลุม จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ละลายอยู่ใน Incompleted media ลงใน well ที่มี Caco-2 / HT29 cell 2 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเหลวทิ้งแล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมสาร tritonX100 (0.05%) 1 มิลลิกรัม ต่อหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี drop plate บนอาหารแข็ง MRS และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

การอ่านผล : จำนวนโคโลนีที่นับได้นำมาคำนวณค่า % การยึดเกาะ

$$\% \text{ Adhesion} = 100 \times \left(\frac{\text{Observed}}{\text{Baseline}} \right)$$

Baseline : จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ทดสอบที่อยู่ใน Incompleted media (DMEM)

Observed : จำนวนแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบหลังจากการบ่มเชื้อไว้ร่วมกับเซลล์ HT29/Caco-2 ใน Incompleted media

3.3.5 การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

1. เพิ่มจำนวน DNA โดยการทำให้ Colony Polymerase Chain Reaction (Colony PCR)

เลือกโคโลนีบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม L- cysteine hydrochloride monohydrate 10 มิลลิกรัม นำมาเจือจางกับ TE buffer 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเตรียมส่วนผสมของ PCR mixture ในหลอดไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบดังในตารางที่ 6.1 นำหลอด PCR ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง spin down เพื่อให้ส่วนประกอบต่างๆ ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.3.5 ส่วนประกอบของสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบของสารในการทำ PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
EmeraldAmp GT PCR Master mix (2X Premix)	25 ไมโครลิตร
Forward Primer	0.5 ไมโครลิตร
Reverse Primers	0.5 ไมโครลิตร
dH ₂ O	14 ไมโครลิตร
DNA Template	10 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50 ไมโครลิตร

2. ตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วยวิธี Horizontal Gel Electrophoresis

นำ PCR product มาตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis เทียบกับ Standard marker ขนาด 1 กิโลเบส ใช้สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบโดยนำ loading dye มาหยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำ PCR product มาผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการผสมโดยการปิเปตขึ้นลงซ้ำๆ หลังจากนั้นดูตัวอย่างที่ผสมกันแล้ว ค่อยๆ โหลดลงหลุม agarose gel อย่างช้าๆ ทำการเปิดเครื่อง โดยศักย์ไฟฟ้าที่ใช้คือ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

3. ขั้นตอนการถ่ายรูปเจล

นำเจลออกจากเครื่อง Gel electrophoresis เข้าเครื่อง UVTEC Chemiluminescence Imager และใช้โปรแกรม UVTEC ในการถ่ายรูปเจล

4. การทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenepHlow™ Gel/PCR Kit

ก. ผสม PCR Product 45 ไมโครลิตร ในหลอด Micro Centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม PCR Buffer 5 เท่าของปริมาตรของ PCR Product ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน

ข. นำหลอด DFH column ใส่ลงในหลอด Collection tube 2 มิลลิลิตร จากนั้น

นำตัวอย่างที่ผสมกันแล้วใส่ลงใน DFH Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในทางปัญญาเท่านั้น เมื่อผู้จัดทำเอกสารนี้ประสงค์จะเผยแพร่เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14,000-16,000 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว เทส่วนที่เป็นส่วนใสทิ้ง

- ค. ดูด wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ที่เติมเอทานอลแล้ว) ใส่ลงในหลอด DFH Column วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000-16,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว เทส่วนที่เป็นส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เป็นเวลา 3 นาที
- ง. นำ Elution Buffer ไปให้ความร้อนที่ 60-70 องศาเซลเซียส ดูดลงหลอด DFH Column หลอดใหม่ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000-16,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที
- จ. เก็บส่วนที่บริสุทธิ์ลงหลอด Micro Centrifuge และนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดนิวคลีอิก
- ฉ. ทำการวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเครื่อง Nanodrop ทำการดูดตัวอย่าง DNA บริสุทธิ์ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนเครื่อง Nanodrop และบันทึกปริมาณกรดนิวคลีอิกโดยใช้โปรแกรม Nanodrop
- ช. ทำการวิเคราะห์หาลำดับยีนและระบุสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยโปรแกรม BioEdit ทำการตัดลำดับยีนด้วยโปรแกรม BioEdit โดยลำดับยีนที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อไป

3.3.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ได้แก่ Ampicillin (AMP) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม, Chloramphenicol (C) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม, Tetracycline (TE) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม, Kanamycin (K) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม, Vancomycin (VA) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม, Clindamycin (DA) ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม, Streptomycin (S) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม, Gentamicin (GN) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และ Erythromycin (E) ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม ด้วยวิธี Disc diffusion assay (โดยดัดแปลงจากวิธีของ National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1983) ทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วนำมาปรับปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 ที่ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 ของโคโลนี/มิลลิลิตร แล้วนำไป Swab ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate ด้วยไม้พันสำลี

(cotton swab) เป็น 3 แนวระนาบให้เชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะลงบนผิวหน้าอาหารด้วยเทคนิค ปลอดภัย แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เมื่อครบเวลาบ่ม วัดผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบแผ่นยาปฏิชีวนะ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับตารางแปลผลมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute Interpretive chart (CLSI), 2021 ดังตารางที่ 3.3.6

ตารางที่ 3.3.6 ค่ามาตรฐานสำหรับการอ่านผลความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียและยีสต์

No.	Antimicrobial agent	Disc Content (µg)	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole (mm.)		
			R	I	S
1	Ampicillin (AMP)	10	≤13	14-16	≥17
2	Chloramphenicol (C)	30	≤12	13-17	≥18
3	Clindamycin (DA)	2	≤15	16-18	≥19
4	Erythromycin (E)	15	≤13	14-22	≥23
5	Gentamicin (GN)	10	≤12	13-14	≥15
6	Kanamycin (K)	30	≤13	14-17	≥18
7	Streptomycin (S)	10	≤11	12-20	≥21
8	Tetracycline (TE)	30	≤11	12-14	≥15
9	Vancomycin (VA)	30	≤14	15-16	≥17

ที่มา: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021. (CLSI) R = Resistant, I = Intermediate, S = Sensitivity

3.3.7 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) ทดสอบโดยการนำแบคทีเรียกรดแลคติก แต่ละไอโซเลตมาขีดลงบน Blood Agar โดยวิธี Single streak หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดผลโดยการสังเกตการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยการย่อยเม็ดเลือดแดงมีทั้งหมด 3 ลักษณะ คือ β -hemolysis คือย่อยสลายแบบสมบูรณ์ ซึ่งจะพบ clear zone ใสรอบๆรอยขีด, α -hemolysis คือการย่อยสลายบางส่วน มีสีเขียวรอบๆรอยขีด และ γ -hemolysis คือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (Wang et al., 2016) โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -hemolysis และ α -hemolysis จะไม่ถูกนำไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป 3.3.7 รูปแสดงตัวอย่างการย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ β -hemolysis, α -hemolysis และ γ -hemolysis ตามลำดับ (Sugar, 2021)

3.3.8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

1. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

2. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ก. เลี้ยงเชื้อ *E. coli* (ATCC 8739) ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB)

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

ข. เลี้ยงเชื้อ *Listeria monocytogenes* (DMST 13820) ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

ค. เลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. เลี้ยงเชื้อ *Salmonella Typhimurium* (TISTR 292) ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

จ. เลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

ฉ. เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus Enteritidis* (DMST 15676) ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

ช. เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) ในอาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHI) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

ซ. เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus epidemidis* (TISTR 518) ในอาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHI) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85% ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 (ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

3. ขั้นตอนการทดสอบ

เตรียมอาหารแข็ง Brain Heart Infusion (BHI) ใช้ Cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะหลุมวุ้น จากนั้นปรับความขุ่นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เตรียมไว้ในข้อ 9.2 ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 ที่ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร แล้ว Swab ลงบนผิวหน้าอาหาร เมื่อทำการ Swab เชื้อแล้ว ดูดเชื้อที่ใช้ทดสอบปริมาตร 70 ไมโครลิตร ปิเปตลงในหลุมวุ้น แล้วบ่มตามสภาวะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค วัดผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส และนำมาคำนวณขนาดของโซนที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.9 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme Activity Assay)

เป็นการทดสอบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้หรือไม่ ได้แก่เอนไซม์ α -Glucosidase, α -Amylase และ Pancreatic Lipase ซึ่งเป็น เอนไซม์สำคัญในกระบวนการย่อยไขมันและคาร์โบไฮเดรต

1. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L-cysteine hydrochloride monohydrate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ โดยจะทำการทดสอบเชื้อ 3 รูปแบบ ได้แก่ ส่วนใส (Supernatant) เชื้อมีชีวิต (Live Cell) และเชื้อตาย (Heat killed) จึงต้องมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

ก. การเตรียมส่วนใส (Supernatant)

นำเชื้อที่เจริญดีแล้วในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม 0.05% L- cysteine hydrochloride monohydrate เทลงในหลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน หลังจากนั้นทำการแยกส่วนใสออก และทำการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ข. การเตรียมเชื้อมีชีวิต (Live Cell)

นำตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาละลายกลับด้วย 0.85% NaCl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบ เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อล้างตะกอน จากนั้นเท 0.85% NaCl ที่ทิ้ง และละลายกลับด้วย 0.85% NaCl อีกครั้ง จากนั้นนำไปปรับความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density) ให้เท่ากับ 0.8 โดยวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะได้ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค. การเตรียมเชื้อตาย (Heat killed)

นำเชื้อที่มีชีวิต (Live cell) ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ไปให้ความร้อนใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วแช่เย็นทันที แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.9.1 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ α -Glucosidase Screening Assay

α -glucosidase เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากลำไส้เล็กมีความสำคัญต่อการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในผู้ป่วยเบาหวาน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ α -glucosidase เพื่อทำการศึกษาว่าตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ได้หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับ Acarbose ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase ได้

Acarbose เป็นยารักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ คือ ตัวยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งกลุ่มเอนไซม์ในลำไส้เล็กที่มีชื่อว่า Glycoside hydrolase โดยเฉพาะเอนไซม์ α -glucosidase ไม่ให้เปลี่ยนแปลงหรืออาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่บริโภคเข้าไปเป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็กลง ส่งผลให้ลำไส้เล็กดูดซึมน้ำตาลโมเลกุลเล็กกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อยลง ช่วยในการบำบัดอาการเบาหวานประเภทที่ 2 (Borgström, 1988) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase จะทำให้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้

ผู้ทดลองได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ α -glucosidase ของโพรไบโอติก โดยใช้ p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) เป็นสารตั้งต้นซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากับ α -glucosidase จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสารตั้งต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็น p-nitrophenol ซึ่งเป็น สารละลายสีเหลือง และน้ำตาลกลูโคส สามารถติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย Microplate Reader โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

ก. ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ Yeast α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) 0.2 units มิลลิลิตร

ผสมเอนไซม์ Yeast α -Glucosidase 13 ไมโครลิตร (75 units/มิลลิลิตร) ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร

ข. ขั้นตอนการเตรียมสับสเตรต p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside

ชั่ง p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 1.8 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1500 ไมโครลิตร

ค. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Acarbose

ชั่ง Acarbose 13 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการทดสอบ

- ก. ทำการหยอดสารละลายมาตรฐาน Acarbose และตัวอย่าง ลง 96 well plate ½ plate ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ในแถว A2-H12 หลังจากนั้นหยอดสารละลายบัฟเฟอร์ลงในแถว A1-D1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม และหยอดสารละลายบัฟเฟอร์ลงในหลุม E1-H1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม
- ข. ทำการหยอดเอนไซม์ Yeast α -Glucosidase ลงในแถว A1-D1 และ ในแถว A2-H12
- ค. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- ง. ทำการหยอดสับสเตรต p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ลงทุกหลุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- จ. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เมื่อครบเวลาบ่มแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดย ใช้ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตั้งต้น

As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากการเติมสารตัวอย่าง

3.3.9.2 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ α - Amylase Screening Assay Optimisation

เป็นวิธีการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ เพื่อทำการศึกษว่าตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ได้หรือไม่ โดย α - amylase เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้ง และไกลโคเจนที่ตำแหน่งอัลฟา 1,4 ทำให้โมเลกุลของแป้งและไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทสและกลูโคส เอนไซม์ α -amylase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในระบบย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ เช่น ในน้ำลายและน้ำย่อยจากตับอ่อน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -Amylase ของโพรไบโอติก โดยการเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐาน Acarbose โดยใช้ 4-nitrophenyl α -D-maltohexaside (PNPG6) เป็นสารตั้งต้นซึ่งเป็น สารละลายใสไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากับ α - Amylase จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสารตั้งต้น ได้ผลิตภัณฑ์ เป็น p-nitrophenol ซึ่งเป็น สารละลายสีเหลือง และน้ำตาลกลูโคส สามารถติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย Microplate Reader โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

ก. ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ α - Amylase (3.2.1.1) from Porcine Pancreas

ละลายเอนไซม์ α - Amylase (3.2.1.1) from Porcine Pancreas ใน Hepes buffer 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

ข. ขั้นตอนการเตรียมสับสเตรต (PNPG6) 4-nitrophenyl α -D-maltohexaside

ทำการชั่งสาร (PNPG6) 4-nitrophenyl α -D-maltohexaside 8.3 มิลลิกรัม ละลายใน Hepes buffer 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร

ค. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Acarbose

ชั่ง Acarbose 6.46 มิลลิกรัม ละลายใน Hepes buffer 50 ไมโครโมลาร์ 100 ไมโครลิตร

2. ขั้นตอนการทดสอบ

ก. หยอดสารละลายมาตรฐาน Acarbose และตัวอย่าง ลง 96 well plate ½ plate 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ในแถว A2-H12 หลังจากนั้นหยอดสารละลายบัฟเฟอร์ลงในแถว A1-D1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม และหยอดสารละลายบัฟเฟอร์ลงในหลุม E1-H1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม

ข. ทำการหยอดเอนไซม์ α - Amylase (3.2.1.1) from Porcine Pancreas ลงในแถว A1-D1 และ ในแถว A2-H12 20 ไมโครลิตร

ค. นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ง. ทำการหยอดสับสเตรต (PNPG6) 4-nitrophenyl α -D-maltohexaside ลงทุกหลุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อครบเวลาบ่มแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตั้งต้น

As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากการเติมสารตัวอย่าง

3.3.9.3 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ Pancreatic Lipase Screening Assay

Pancreatic lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างมาจากตับอ่อน ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายไขมันจากอาหารที่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นไขมันที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กลง พบได้ในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ ร่างกายใช้เอนไซม์ไลเปสในการสลายไขมันในอาหารเพื่อให้ลำไส้สามารถดูดซึมได้ การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์เป็นการศึกษาว่าตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase ได้หรือไม่ โดย 4-Methyl Umbelliferyl Oleate ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Pancreatic lipase ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-methylumbelliferone (4-MU) และ Oleic acid

Orlistat เป็นยาลดความอ้วนมีโครงสร้างคล้ายกับสารตั้งต้นตามธรรมชาติสำหรับเอนไซม์ Pancreatic lipase ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ในอาหาร มีกลไกการยับยั้งโดยสร้างพันธะโควาเลนต์จับกับบริเวณ Active site ของ Pancreatic lipase ทำให้ Pancreatic lipase ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ จึงทำให้ไขมันยังคงอยู่ในลักษณะที่เป็นโมเลกุลใหญ่จึงไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ทำให้เกิดการขับถ่าย เป็นไขมันออกทางอุจจาระ (Borgström, 1988)

1. ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

ก. ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ Pancreatic lipase (Type II, from Porcine Pancreas)

ซึ่งเอนไซม์ Pancreatic lipase (Type II, from Porcine Pancreas) 5 มิลลิกรัม ละลายใน Tris-HCl buffer 0.1 โมโคโรโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ขั้นตอนการเตรียมสับสเตรต 4-Methyl Umbelliferyl Oleate

ผสม 4-Methyl Umbelliferyl Oleate 12.5 ไมโครลิตร (100 ไมโครโมลาร์) ใน Tris-HCl buffer 0.1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 มิลลิตร (ก่อนใช้งาน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

ค. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Orlistat

ชั่ง Orlistat 4.95 มิลลิกรัม ละลายใน Tris-HCl buffer 0.1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิตร

2. ขั้นตอนการทดสอบ

ก. ทำการหยอดสารละลายมาตรฐาน Orlistat และตัวอย่าง ลง 96 well plate ½ area black plate 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ในแถว A2-H12 หลังจากนั้นหยอดสารละลายบัฟเฟอร์ลงในแถว A1-D1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม และหยอดสารละลายบัฟเฟอร์ลงในหลุม E1-H1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม

ข. ทำการหยอดเอนไซม์ Pancreatic lipase (Type II, from Porcine Pancreas) ลงในแถว A1-D1 และ ในแถว A2-H12 20 ไมโครลิตร

ค. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที

ง. ทำการหยอดสับสเตรต 4-Methyl Umbelliferyl Oleate ลงทุกหลุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

จ. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที

เมื่อครบเวลาบ่มแล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสง (Fluorescence) ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้ความยาวคลื่น Excitation 360 นาโนเมตร และความยาวคลื่น Emission 460 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตั้งต้น
เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของโรงเรียนราชประชานุเคราะห์ 37 จังหวัดนครราชสีมา ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากการเติมสารตัวอย่าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

ผลการคัดแยกตัวอย่างจากอาหารและแหล่งธรรมชาติต่างๆ ได้แก่ ดิน พืช และมูลม้า จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว และ วิธี Streak plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม 0.05% L-cysteine hydrochloride monohydrate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต

ดังแสดงในตารางที่ 4.1

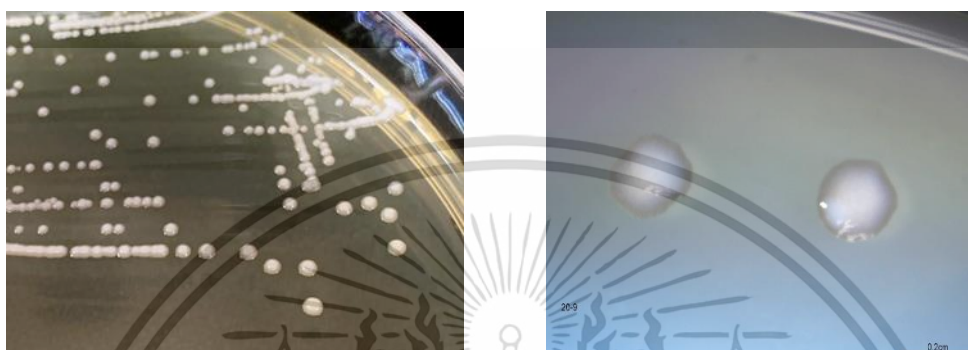
ตารางที่ 4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา
1	1-4-1	ดอกเทียน	อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน
2	16-1/1	มูลม้า	อำเภอบัว จังหวัดน่าน
3	16-1/2		
4	16-1/3		
5	16-1/4		
6	16-2-1		
7	16-2/2		
8	20-6	ผักกาดดอง	อำเภอเวียง จังหวัดน่าน
9	20-9		
10	21-7	ดอกคุณนายตื่นสาย	อำเภอเมืองแพร่ จังหวัดน่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 ไอโซเลต โดยการดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม 0.05% L-cysteine hydrochloride monohydrate ผลการศึกษาพบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก แต่ละไอโซเลตมีลักษณะกลม นูน มันวาว ขอบเรียบ สีขาว และมีลักษณะแบน มันวาว ขอบหยัก สีครีม ดังแสดงในรูป 4.1.1



(ก)

(ข)

รูป 4.1.1 ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS

(ก) ลักษณะของโคโลนีที่มีลักษณะกลม นูน มันวาว ขอบเรียบ สีขาว

(ข) ลักษณะของโคโลนีที่มีลักษณะแบน มันวาว ขอบหยัก สีครีม

4.1.2 การทดสอบการติดสีแกรม (Gram's stain) รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ของแบคทีเรียย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และรูปร่างของเซลล์มีลักษณะกลม (Coccus) และรูปร่างท่อน (Rod) ดังแสดงในตารางที่ 4.2.1

4.2 การทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นของจุลินทรีย์โปรไบโอติก

4.2.1 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolysis)

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงเป็นการทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งการย่อยเม็ดเลือดแดงมี 3 ลักษณะ คือ

- Beta Hemolysis (β -hemolysis) คือย่อยสลายแบบสมบูรณ์ ซึ่งจะเกิดโซนใส (clear zone) รอบๆ รอยขีดของเชื้อทดสอบ

ไม่ว่าการแก้ไขที่ทันสมัย ยากยิ่งให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Alpha Hemolysis (α -hemolysis) คือมีผลกระทบต่อเม็ดเลือดแดงบางส่วน จะเกิดสีเขียวรอบๆรอยขีด
- Gamma Hemolysis (γ -hemolysis) คือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ

ผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ พบว่า ทั้ง 10 ไอโซเลต มีการย่อยแบบ Gamma Hemolysis (γ -hemolysis) คือไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง ดังแสดงในตาราง 4.2.1 เชื้อทุกไอโซเลตจึงได้ทำการนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, การทดสอบคะตาเลส และผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	แกรม	รูปร่างเซลล์	ลักษณะโคโลนี	ทดสอบคะตาเลส	การย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolysis)
1	1-4-1	+	Rod	Circular, Entire edge, Convex, Smooth surface, Color white	-	γ -hemolysis
2	16-1/1	+	Rod	Circular, Entire edge, Convex, Smooth surface, Color white	-	γ -hemolysis
3	16-1/2	+	Rod	Circular, Entire edge, Smooth surface, Pulvinate, Color white	-	γ -hemolysis
4	16-1/3	+	Rod	Circular, Entire edge, Smooth surface, Pulvinate, Color white	-	γ -hemolysis
5	16-1/4	+	Rod	Circular, Entire edge, Smooth surface, Convex, Color white	-	γ -hemolysis
6	16-2-1	+	Rod	Circular, Entire edge, Smooth surface, Convex, Color white	-	γ -hemolysis
7	16-2/2	+	Coccus	Circular, Entire edge, Smooth surface, Umbonate, Color white	-	γ -hemolysis
8	20-6	+	Coccus	Circular, Entire edge, Smooth surface, Convex, Color white	-	γ -hemolysis
9	20-9	+	Rod	Circular, Irregular, Smooth surface, Flat, Color white	-	γ -hemolysis
10	21-7	+	Coccus	Circular, Entire edge, Smooth surface, Convex, Color white	-	γ -hemolysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ไม่ดีต่อยาปฏิชีวนะ เป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญเพื่อจะบ่งชี้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตนั้นมีความปลอดภัย ซึ่งจะต้องทำการทดสอบก่อนที่จะนำจุลินทรีย์นั้นไปใช้เป็นโพรไบโอติก โดยในงานวิจัยนี้ทำการทดสอบด้วยเทคนิค agar disc diffusion กับยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ได้แก่ Ampicillin (AMP) 10 ไมโครกรัม, Chloramphenicol (C) 30 ไมโครกรัม, Tetracycline (TE) 30 ไมโครกรัม, Kanamycin (K) 30 ไมโครกรัม, Vancomycin (VA) 30 ไมโครกรัม, Clindamycin (DA) 2 ไมโครกรัม, Streptomycin (S) 10 ไมโครกรัม, Gentamicin (GN) 10 ไมโครกรัม และ Erythromycin (E) 15 ไมโครกรัม พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต ให้ผลมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.2.2 โดยสรุปดังนี้

- มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด คือ Ampicillin (AMP), Chloramphenicol (C), Clindamycin (DA), Erythromycin (E) และ Tetracycline (TE)
- ดีต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด คือ Gentamicin (GN), Kanamycin (K), Streptomycin (S) และ Vancomycin (VA)

จากข้อมูลการศึกษามีการรายงานไว้ว่าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกดีต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin แบบ Intrinsic factors คือจะไม่สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยานี้ให้กับเชื้อจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากกลไกการทำงานของ Vancomycin ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นโดยยาจะเข้าไปจับกับกรดอะมิโน D-alanine ที่ตำแหน่งปลายของสายของ muramyl pentapeptide ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในโครงสร้างของ peptidoglycan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้เพราะไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ให้สมบูรณ์ได้ ซึ่ง (Delcour et al., 1999) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ จีนิส (Genus) *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococci* และ *Lactobacillus* จะมีการแทนที่กรดอะมิโน D-alanine ด้วย D-lactate หรือ D-serine จึงทำให้ Vancomycin ไม่สามารถเข้าจับได้ ส่งผลให้แบคทีเรียในจีนิสดังกล่าว เกิดการดื้อต่อ Vancomycin

ส่วนการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกดีต่อยากลุ่ม aminoglycosides (Kanamycin, Neomycin, Gentamicin และ Streptomycin) ได้รับการพิจารณาว่าเป็นการดื้อยา แบบ Intrinsic factor เพราะแบคทีเรียไม่มีสารตัวกลาง cytochrome mediated electron transport ที่จะดูดซึมตัวยากลุ่มนี้เข้าสู่วงจรการเจริญของเซลล์ (Charteris et al., 2001; Danielsen and Wind, 2003) ดังนั้นแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยา Gentamicin (GN), Kanamycin (K), Streptomycin (S) และ Vancomycin (VA) จึงสามารถนำไปใช้ทดสอบเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในขั้นต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2.2 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	การดื้อยาปฏิชีวนะ								
		AMP	C	DA	E	GN	K	S	TE	VA
1	1-4-1	S	S	S	S	R	R	R	S	R
2	16-1/1	S	S	S	S	R	R	R	S	R
3	16-1/2	S	S	S	S	R	R	R	S	R
4	16-1/3	S	S	S	S	R	R	R	S	R
5	16-1/4	S	S	S	S	R	R	R	S	R
6	16-2-1	S	S	S	S	R	R	R	S	R
7	16-2/2	S	S	S	S	R	R	R	S	S
8	20-6	S	S	S	S	R	R	R	S	R
9	20-9	S	S	S	S	R	R	R	S	S
10	21-7	S	S	S	S	R	R	R	S	R

ที่มา: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021. (CLSI) R = Resistant, I = Intermediate, S = Sensitivity

4.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

4.3.1 การทดสอบการทนกรดและทนต่อเกลือน้ำดี (Bile-Salt Resistance)

จุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นโพรไบโอติกจะต้องสามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก จึงต้องมีการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรด เท่ากับ 2 และเกลือน้ำดีที่มีค่าความเป็นด่างเท่ากับ 8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (180 นาที) ตามสภาวะระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ ผลการทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้พบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งหมด 10 ไอโซเลต มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะคล้ายน้ำย่อยที่มีความเป็นกรด pH 2 เป็นเวลา 90 และ 180 นาที ได้ร้อยละ 92.72 - 99.26 และ 89.09 - 99.37 ตามลำดับ และความสามารถในการอยู่รอดในเกลือน้ำดี pH 8 เป็นเวลา 90 และ 180 นาที ได้ร้อยละ 91.89 - 99.76 และ 85.05 - 99.84 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 4.3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Adhesion Test)

ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติของความเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ดีจะช่วยให้โพรไบโอติกสามารถคงอยู่และเพิ่มจำนวนได้ ช่วยรักษานิตของจุลินทรีย์ที่ดีให้มีอยู่ในร่างกาย ช่วยย่อยและสร้างสารที่จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ ในงานวิจัยนี้ทำการทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (Colorectal adenocarcinoma cells) 2 ชนิด คือ CaCo-2 และ HT-29 พบว่า แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสามารถยึดเกาะเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดได้แตกต่างกันไป แต่ไม่สามารถยึดเกาะได้เลยในบางไอโซเลต เช่น ไอโซเลต 1-4-1 ไม่สามารถยึดเกาะเซลล์ไลน์ CaCo-2 ได้ ไอโซเลต 16-2-1 ไม่สามารถยึดเกาะเซลล์ไลน์ HT-29 ได้ และไอโซเลต 20-6 ไม่สามารถยึดเกาะเซลล์ไลน์ได้ทั้ง CaCo-2 และ HT-29 ส่วนไอโซเลตอื่นๆ สามารถยึดเกาะ CaCo-2 และ HT-29 ได้ในช่วงร้อยละ 53.33 ± 0.52 - 97.55 ± 0.09 และ 2.94 ± 0.41 - 96.67 ± 0.41 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 4.3.1

ตารางที่ 4.3.1 การอยู่รอดของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในสภาวะคล้ายน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารที่เป็นกรดและเกลือแร่ และความสามารถในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้

ลำดับ	ไอโซเลต	การอยู่รอดของแบคทีเรียในสภาวะคล้ายน้ำย่อยที่ระยะเวลาต่างๆ (เปอร์เซ็นต์)				การยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (เปอร์เซ็นต์)	
		pH 2 (Pepsin)		pH 8 (Bile Salt)		Caco-2	HT29
		T90	T180	T90	T180		
1	1-4-1	99.26 ± 0.22	96.87 ± 0.13	99.43 ± 0.04	94.67 ± 0.27	0	84.48 ± 0.07
2	7-2	97.17 ± 0.46	95.00 ± 0.40	98.35 ± 0.31	96.80 ± 0.16	53.33 ± 0.52	88.33 ± 0.33
3	16-1/2	98.98 ± 0.02	99.37 ± 0.04	91.89 ± 0.12	95.33 ± 0.55	87.50 ± 0.31	78.33 ± 0.15
4	16-1/4	97.36 ± 0.18	98.49 ± 0.20	97.77 ± 0.15	98.20 ± 0.40	65.39 ± 0.08	63.28 ± 0.19
5	16-2-1	92.72 ± 0.13	89.55 ± 0.49	99.76 ± 0.23	99.84 ± 0.03	59.32 ± 0.08	0
6	16-2/2	98.39 ± 0.34	89.09 ± 0.28	98.85 ± 0.05	89.95 ± 0.16	55.56 ± 0.12	96.67 ± 0.41
7	20-6	96.52 ± 0.07	95.41 ± 0.14	98.62 ± 0.43	96.84 ± 0.4	0	0
8	20-9	97.67 ± 0.31	94.50 ± 0.04	98.38 ± 0.29	98.83 ± 0.06	97.55 ± 0.09	90.00 ± 0.40
9	21-7	98.67 ± 0.38	93.84 ± 0.27	98.85 ± 0.11	98.97 ± 0.11	97.37 ± 0.12	83.33 ± 0.24
10	29-1	95.10 ± 0.01	90.79 ± 0.25	99.00 ± 0.03	85.05 ± 0.09	83.93 ± 0.01	2.94 ± 0.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA พบว่าสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียได้เป็น 4 สปีชีส์ (Species) ดังนี้

- 1) *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลต 1-4-1, 16-1/1, 16-1/2 และ 16-2-1
- 2) *Limosilactobacillus fermentum* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลต 16-1/3, 16-1/4, และ 20-9
- 3) *Pediococcus pentosaceus* จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลต 16-2/2
- 4) *Enterococcus hirae* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลต 20-6 และ 21-7

โดยมีรายละเอียดของเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียง และความยาวของนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 4.3.3 จากผลการจัดจำแนกนี้พบว่าทุกสายพันธุ์มีรายงานว่ามีความปลอดภัย โดยเฉพาะ *Lacticaseibacillus paracasei* เป็นสายพันธุ์ที่มีชื่อตรงกับรายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัย อนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (กระทรวงสาธารณสุข, 2554) *Limosilactobacillus fermentum* ได้รับการยอมรับจากทั่วโลก ยืนยันว่าไม่มียีนที่เข้ารหัสลักษณะความรุนแรงหรือสารเมตาโบไลต์ที่เป็นอันตราย หรือยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Nataraj et al., 2023) *Pediococcus pentosaceus* ได้รับการรายงานว่าเป็นสปีชีส์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและการเลี้ยงสัตว์ มีความสามารถในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้ *P. pentosaceus* จึงมีศักยภาพสูงและได้รับการยอมรับให้เป็นโพรไบโอติก (Jiang et al., 2021) และมีรายงานว่ามีการศึกษาการใช้ *Enterococcus hirae* หมักกับนมแพะ ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันให้สุนัข และช่วยปรับสมดุลในลำไส้ของสุนัขได้ (de Castro Santos Melo et al., 2021) ดังนั้นจากสายพันธุ์ที่ผ่านการจัดจำแนกนี้ ทั้งหมดจึงน่าจะมีความปลอดภัย ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง ไม่ถ่ายทอดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดและเกลือแร่ในสภาวะคล้ายน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหาร และมีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ไลน์ได้ โดยสายพันธุ์ที่จะถูกนำไปใช้ศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกในขั้นต่อไป มีจำนวนทั้งสิ้น 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Limosilactobacillus fermentum* 3 สายพันธุ์, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* 2 สายพันธุ์, *Pediococcus pentosaceus* 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus hirae* 1 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3.3 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับ	ตัวอย่างที่ใช้ คัดแยก	ไอโซเลต	ผลการจัดจำแนกมีความใกล้เคียงกับ	ความใกล้เคียง (% Similarity)	ความยาวของ ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ (bp)
1	ดอกเทียน	1-4-1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	100	1407
			<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99.93	
2	มูลม้า	16-1/1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	100	1413
			<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99.93	
3	มูลม้า	16-1/2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99.87	1493
			<i>Lacticaseibacillus zeae</i>	99.19	
			<i>Lacticaseibacillus chiayiensis</i>	99.19	
4	มูลม้า	16-1/3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.79	1398
5	มูลม้า	16-1/4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.79	1406
6	มูลม้า	16-2-1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	100	1420
			<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99.93	
			<i>Lacticaseibacillus zeae</i>	99.22	
7	มูลม้า	16-2/2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	1413
8	ผักกาดดอง	20-6	<i>Enterococcus hirae</i>	99.93	1353
			<i>Enterococcus durans</i>	99.78	
9	ผักกาดดอง	20-9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.86	1405
10	ดอกคูนนายต้น สาย	21-7	<i>Enterococcus hirae</i>	100	1354

หมายเหตุ : *Limosilactobacillus fermentum* **Lactobacillus fermentum* (Beijerinck 1901 Approved Lists 1980) เปลี่ยนชื่อเป็น *Limosilactobacillus fermentum* (Zheng et al. 2020)

4.3.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจำนวน 8 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (DMST 13820), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella Typhimurium* (TISTR 292), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus Enteritidis* (DMST 15676), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) และ *Streptococcus epidemidis* (TISTR 518) พบว่าโพรไบโอติกจำนวน 10 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้แตกต่างกัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรไบโอติก *Limosilactobacillus fermentum* 2 สายพันธุ์ จากไอโซเลต 16-1/4 และ 20-9 ที่ทำการทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้เพียง 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

โพรไบโอติก *Pediococcus pentosaceus* 1 สายพันธุ์ จากไอโซเลต 16-2/2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) ดังแสดงในตาราง 4.3.4

ตารางที่ 4.3.4 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Agar well diffusion

หมายเหตุ : NA = Not Analysis = ไม่ได้ทดสอบ

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	สายพันธุ์	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (เซนติเมตร)							
			<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>L. monocytogenes</i> (DMST 13820)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	<i>Sal. Typhimurium</i> (TISTR 292)	<i>St. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Str. Enteritidis</i> (DMST 15676)	<i>Str. mutans</i> (ATCC 25175)	<i>Str. epidemidis</i> (TISTR 518)
1	1-4-1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	0.7	0.6	0.8	0.5	0.2	0.7	0.7	0.1
2	7-2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	16-1/2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	0.4	0.8	0.5	0.2	0.2	0.3	0.7	0.2
4	16-1/3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	16-1/4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	0.2	0.6	0	0	1.5	0.2	0	0
6	16-2-1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	0.8	1.2	0.9	0.3	0.2	0.5	0.7	0.6
7	16-2/2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0.4	0.7	0.1	0.2	0.5	0.4	1.3	0.5
8	20-6	<i>Enterococcus hirae</i>	0.6	0.2	0.7	0.1	0.1	0.4	0	0
9	20-9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	0.4	0.5	0	0	1.3	0.3	0	0
10	21-7	<i>Enterococcus hirae</i>	0.5	0.1	0.6	0.1	0.1	0.3	0	0

4.3.5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase Screening Assay

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase โดยใช้สารมาตรฐาน Acarbose เป็นสารควบคุมเชิงบวก (Positive Control) พบว่า Acarbose ที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 58.21 ดังแสดงในตาราง 4.3.5 จึงใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

กลไกในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase คือ เมื่อสารมาตรฐาน Acarbose จับกับบริเวณ active site ของ α -glucosidase จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์คาร์โบไฮเดรต การจับกันของ Acarbose กับ α -glucosidase จะทำให้การสลายคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวช้าลง จึงส่งผลให้อัตราการดูดซึมกลูโคสในลำไส้เล็กลดลง ในการทดลองนี้ใช้ Acarbose เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบกับโพรไบโอติกที่เป็นตัวอย่างทดสอบ ซึ่งเชื้อโพรไบโอติกนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไบโอดีคที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน จัดได้ว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase

ผลการศึกษากิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของโพรไบโอดีค พบว่าส่วนใส (Supernatant) ของ *Pediococcus pentosaceus* (จากไอโซเลต 16-2/2) แสดงผลการยับยั้ง α -glucosidase ได้สูงกว่าโพรไบโอดีคสายพันธุ์อื่นๆ โดยยับยั้งได้ร้อยละ 37.35 ± 3.33 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแล้ว ให้ผลการยับยั้งที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตาราง ตาราง 4.3.5

ตารางที่ 4.3.5. การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของ โพรไบโอดีค และ Acarbose

ลำดับ	สารทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง α -glucosidase \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
		Supernatant	Live cell	Heat killed
1	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (1-4-1)	8.65 \pm 4.29	-39.45 \pm 3.43	-10.52 \pm 17.09
2	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-1/1)	NA	NA	NA
3	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-2/2)	6.95 \pm 1.79	-62.44 \pm 4.60	-59.01 \pm 0.42
4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (16-1/3)	NA	NA	NA
5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (16-1/4)	21.61 \pm 0.51	-59.50 \pm 1.10	-71.95 \pm 4.76
6	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-2-1)	27.40 \pm 0.19	-45.37 \pm 28.41	-19.89 \pm 13.08
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (16-2/2)	37.35 \pm 3.33	-73.70 \pm 1.09	-69.30 \pm 6.06
8	<i>Enterococcus hirae</i> (20-6)	33.96 \pm 3.62	-65.81 \pm 0.61	-59.42 \pm 4.62
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (20-9)	7.81 \pm 1.18	-52.60 \pm 0.11	-20.59 \pm 9.71
10	<i>Enterococcus hirae</i> (21-7)	20.46 \pm 9.01	-25.79 \pm 2.93	-11.89 \pm 0.68
11	Positive Control (Acarbose 0.12 mM)		58.21	

4.3.6 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ α -Amylase

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase โดยใช้สารมาตรฐาน Acarbose เป็นสารควบคุมเชิงบวก (Positive Control) พบว่าสาร Acarbose ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ได้ร้อยละ 79.33 ดังแสดงในตาราง 4.3.6 จึงใช้ Acarbose เป็นเกณฑ์มาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวอย่างทดสอบ

กลไกในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase คือ Acarbose ที่มีโครงสร้างเป็นซูโดแซ็กคาไรด์ มีลักษณะคล้ายกับโมเลกุลของกลูโคส จะจับกับ active site ของ α -amylase จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง ซึ่งจะไปรบกวนความสามารถของเอนไซม์ α -amylase ในการไฮโดรไลซ์คาร์โบไฮเดรตอย่างมีเอกสารเป็นเอกสารทสองวนเวสสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพ และการจับกันของ Acarbose กับ α -amylase จะป้องกันไม่ให้เอนไซม์ย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

จากการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ของโพรไบโอติก จะเห็นได้ว่า ส่วนใส (Supernatant) ของ *Limosilactobacillus fermentum* (จากไอโซเลต 20-9) แสดงผลการยับยั้ง α -amylase ได้สูงกว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆ โดยยับยั้งได้ร้อยละ 58.60 ± 8.03 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแล้ว ให้ผลการยับยั้งที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตาราง 4.3.6

ตาราง 4.3.6 การยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของโพรไบโอติก และ Acarbose

ลำดับ	สารทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง α -amylase \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
		Supernatant	Live cell	Heat killed
1	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (1-4-1)	42.79 \pm 9.09	-25.62 \pm 18.02	-32.85 \pm 7.32
2	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-1/1)	46.96 \pm 6.90	-58.97 \pm 0.08	-17.78 \pm 32.87
3	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-2/2)	48.94 \pm 1.14	-20.62 \pm 9.62	-30.39 \pm 0.45
4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (16-1/3)	50.88 \pm 0.40	-6.04 \pm 8.08	-18.19 \pm 0.79
5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (16-1/4)	31.49 \pm 2.99	-13.57 \pm 0.03	-31.25 \pm 2.83
6	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-2-1)	48.79 \pm 0.03	-6.04 \pm 8.08	-24.00 \pm 1.56
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (16-2/2)	51.39 \pm 0.32	-59.85 \pm 3.06	-35.13 \pm 7.32
8	<i>Enterococcus hirae</i> (20-6)	50.55 \pm 1.08	-31.00 \pm 3.01	9.57 \pm 1.16
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (20-9)	58.60 \pm 8.03	-10.58 \pm 1.03	-1.47 \pm 14.77
10	<i>Enterococcus hirae</i> (21-7)	52.81 \pm 9.78	-51.33 \pm 3.96	-29.86 \pm 5.36
11	Positive Control (Acarbose 0.4 mM)		79.33	

4.3.7 ผลการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ Pancreatic Lipase

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Pancreatic Lipase โดยใช้สารมาตรฐาน Orlistat เป็นสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) พบว่าสารมาตรฐาน Orlistat ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ Pancreatic Lipase ได้ร้อยละ 70 ดังแสดงในตาราง 4.3.7

จึงใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

Orlistat เป็นยาลดความอ้วนมีโครงสร้างคล้ายกับสารตั้งต้นตามธรรมชาติสำหรับเอนไซม์ Pancreatic lipase ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ในอาหาร มีกลไกการยับยั้งโดยสร้างพันธะโควาเลนต์จับกับบริเวณ Active site ของ Pancreatic lipase ทำให้ Pancreatic lipase ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ จึงทำให้ไขมันยังคงอยู่ในลักษณะที่เป็นโมเลกุลใหญ่จึงไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ทำให้เกิดการขับถ่ายเป็นไขมันออกทางอุจจาระ (Borgström, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase ของโพรไบโอติก จะเห็นได้ว่า ส่วนใส (Supernatant) ของโพรไบโอติกทุกสายพันธุ์ให้ค่าการยับยั้งที่สูงสุด ในช่วงร้อยละ 39.83 ± 1.61 - 92.45 ± 0.27 โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* (จากไอโซเลต 16-2/2) สามารถยับยั้งได้ สูงสุดคือ ร้อยละ 92.45 ± 0.27 และสูงกว่าสารมาตรฐาน Orlistat ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตาราง 4.3.7

4.3.7 การยับยั้งเอนไซม์ Pancreatic lipase ของโพรไบโอติกและ Orlistat

ลำดับ	สารทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Pancreatic lipase \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
		Supernatant	Live cell	Heat killed
1	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (1-4-1)	88.40 ± 0.96	-1.55 ± 2.61	-4.14 ± 0.67
2	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-/1)	92.19 ± 1.25	15.15 ± 24.63	-1.07 ± 1.57
3	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-1/2)	89.23 ± 0.25	5.17 ± 2.32	13.66 ± 15.18
4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (16-1/3)	90.90 ± 6.93	4.59 ± 10.40	3.26 ± 4.19
5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (16-1/4)	39.83 ± 1.61	10.94 ± 4.58	9.74 ± 16.56
6	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (16-2-1)	88.09 ± 3.77	3.90 ± 6.10	6.68 ± 5.55
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (16-2/2)	92.45 ± 0.27	-5.25 ± 1.31	5.81 ± 3.41
8	<i>Enterococcus hirae</i> (20-6)	81.93 ± 11.61	11.17 ± 7.43	50.14 ± 69.97
9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (20-9)	77.61 ± 1.11	3.68 ± 3.47	2.31 ± 23.35
10	<i>Enterococcus hirae</i> (21-7)	78.32 ± 4.12	2.18 ± 40.66	5.67 ± 10.79
11	Positive control (Orlistat 4 mM)		70	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างต่าง ๆ ในจังหวัดน่าน ได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 10 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา และทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างของเซลล์เป็นท่อนสั้น และกลม ไม่มีเอนไซม์อะตาเลส ไม่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง และไม่ถ่ายทอดการติดต่อยาปฏิชีวนะ

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะคล้ายน้ำย่อยที่มีความเป็นกรดและเกลือแร่ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 10 ไอโซเลต มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรด pH 2 เป็นเวลา 90 และ 180 นาที ในช่วงร้อยละ 92.72 ± 0.13 - 99.26 ± 0.22 และ 89.09 ± 0.28 - 99.37 ± 0.04 ตามลำดับ ทำการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะคล้ายน้ำย่อยที่มีเกลือแร่ pH 8 เป็นเวลา 90 และ 180 นาที เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถอยู่รอดในช่วงร้อยละ 91.89 ± 0.12 - 99.76 ± 0.23 และ 85.05 ± 0.09 - 99.84 ± 0.03 ตามลำดับ สำหรับความสามารถในการเกาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ 2 ชนิด คือ Caco-2 และ HT29 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 7 สายพันธุ์ ที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ทั้งสองชนิด ในช่วงร้อยละ 53.33 ± 0.52 - 97.55 ± 0.09 และ 2.94 ± 0.41 - 96.67 ± 0.41 ตามลำดับ

หลังจากนั้นได้ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA พบว่าเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้งหมด 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus paracasei*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus hirae* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ได้รับการรายงานว่ามีความปลอดภัย และเป็นสายพันธุ์ที่มีชื่อตรงกับรายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัยอนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของโพรไบโอติกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่า โพรไบโอติกจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Limosilactobacillus fermentum* 2 สายพันธุ์ และ *Pediococcus pentosaceus* 1 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ คือ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) และ *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) ได้ ตามลำดับ

จากการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ โดยทำการทดสอบส่วนประกอบของเชื้อ 3 ส่วน คือ ส่วนใส (Supernatant) เซลล์มีชีวิต (Live cell) และ เซลล์ตาย (Heat killed) พบว่า ส่วนใส (Supernatant)

ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่าร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

α -amylase และ Pancreatic lipase ที่สูงกว่าเซลล์มีชีวิต (Live cell) และ เซลล์ตาย (Heat killed)

จากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดมีความปลอดภัย ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง ไม่ถ่ายทอดการติดต่อยาปฏิชีวนะ มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดและเกลือแร่ในสภาวะคล้ายน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหาร และมีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์โกลนได้ มีคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติก สามารถนำไปใช้เป็นโพรบิโอติกและทำการศึกษาต่อเพื่อช่วยเสริมสุขภาพในด้านการลดระดับน้ำตาล และไขมันในเลือดได้ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ เป็นต้น เพื่อให้ทราบสถานะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเชื้อแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์ในระดับขยายขนาด หรือการพัฒนาไปใช้ต่อในผลิตภัณฑ์ที่ต้องผ่านกระบวนการต่าง ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ภัทรา พวงช่อ, นาฏศจี นวลแก้ว. (2556).ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดผักพื้นบ้าน (α - Glucosidase Inhibition of Thai Local Vegetable Extracts). **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน**, 50(7), 12-14.
- ผุสดี ตังวชิรินทร์, จิโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์, และกานต์ สุขสุแพทย์. (2559). การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**, 34(2), 67-76.
- Aydin, B., & Onbasi, K. (2021). Lipase inhibitor orlistat: An old but still effective weapon. *Med. Sci*, 10, 1406-1411.
- Borgström, B. (1988). Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 962(3), 308-316.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., & Chen, W. (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. *Food Control*, 35(1), 65-72.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.027>
- Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., & Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, 2(2), 100185.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100185>
- de Castro Santos Melo, C., da Silva Freire, A., Galdeano, M. A., da Costa, C. F., de Oliveira Gonçalves, A. P. D., Dias, F. S., & Menezes, D. R. (2021). Probiotic potential of *Enterococcus hirae* in goat milk and its survival in canine gastrointestinal conditions simulated in vitro. *Research in Veterinary Science*, 138, 188-195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.06.010>
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Divyashree, S., Anjali, P. G., Somashekaraiah, R., & Sreenivasa, M. Y. (2021). Probiotic properties of *Lactobacillus casei* – MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. *Biotechnology Reports*, 32, e00672.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00672>
- Hazards, E. P. o. B. (2012). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA Journal*, 10(12), 3020.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., & Salminen, S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
- Jiang, S., Cai, L., Lv, L., & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 45.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01537-y>
- Juge, N. (2012). Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, 20(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.10.001>
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K., Pattukumar, V., & Arul, V. (2013). Probiotics and its functionally valuable products—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(6), 641-658.
- Kobierecka, P. A., Wyszynska, A. K., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Kuczkowski, M., Tuzimek, A., Piotrowska, W., Górecki, A., Adamska, I., Wieliczko, A., & Bardowski, J. (2017). In vitro characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00512.
- Macho Fernandez, E., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I. G., & Grangette, C. (2011). Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 60(8), 1050-1059.
<https://doi.org/10.1136/gut.2010.232918>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mojgani, N., Hussaini, F., & Vaseji, N. (2015). Characterization of indigenous Lactobacillus strains for probiotic properties. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2).
- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A.3C.1-A.3C.8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- Nami, Y., Hejazi, S., Geranmayeh, M. H., Shahgolzari, M., & Yari Khosroushahi, A. (2022). Probiotic immunonutrition impacts on colon cancer immunotherapy and prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, 32(1), 30-47.
- Nataraj, B. H., Kumari, M., Nagpal, R., Ali, S. A., & Behare, P. V. (2023). Safety evaluation of indigenous probiotic *Limosilactobacillus fermentum* NCDC 400 using whole genome sequences and in vitro approaches. *Food Bioscience*, 56, 103101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103101>
- Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Gancarz, M., & Szymańska, J. (2021). Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*, 26(4), 1172.
- Rashmi, B. S., & Gayathri, D. (2017). Molecular characterization of gluten hydrolysing *Bacillus* sp. and their efficacy and biotherapeutic potential as probiotics using Caco-2 cell line. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 759-772. <https://doi.org/10.1111/jam.13517>
- Ren, F., Ji, N., & Zhu, Y. (2023). Research Progress of α -Glucosidase Inhibitors Produced by Microorganisms and Their Applications. *Foods*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/foods12183344>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Singh, T. P., Kaur, G., Kapila, S., & Malik, R. K. (2017). Antagonistic activity of *Lactobacillus reuteri* strains on the adhesion characteristics of selected pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 486.
- Wang, Y., Li, F., Dong, S., Liu, X., & Li, M. (2016). A facile approach for synthesizing Fe-based layered double hydroxides with high purity and its exfoliation. *Journal*
- เอกสารนี้เป็นเอกสาร based layered double hydroxides with high purity and its exfoliation. *Journal* คำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of Colloid and Interface Science, 467, 28-34.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.058>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์

1. BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth) (Himedia™, India)

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร (Composition)

HM infusion powder	12.500 กรัม
BHI powder	5.000 กรัม
Proteose peptone	10.000 กรัม
Dextrose (Glucose)	2.000 กรัม
Sodium chloride	5.000 กรัม
Disodium phosphate	2.500 กรัม

ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 6.5 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. MRS Broth (de Man Ros) (Merck, Germany)

Peptone from Casein	10.0 กรัม
Meat extract	8.0 กรัม
Yeast extract	4.0 กรัม
D (+) Glucose	20.0 กรัม
Dipotassiumhydrogenphosphate	2.0 กรัม
Tween™ 80	1.0 กรัม
di-Ammonim hydrogen citrate	2.0 กรัม
Sodium acetate	5.0 กรัม
Magnesium sulfate	0.2 กรัม
Manganese sulfate	0.04 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 6.5 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารละลายคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Simulated gastric juice)

Pepsin	1 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำ Pepsin ละลายน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับ pH ให้ได้ 2.0 ด้วยกรด HCl เข้มข้น 4 M ปรับ นำไปกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ

4. สภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (Simulated small intestinal fluid)

Bile salt	0.2 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำ Bile salt ละลายน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับ pH ให้ได้ 8 ด้วยกรด NaOH เข้มข้น 4 M ปรับ นำไปกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอนเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์

NaCl	8.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Blood agar base

Blood agar base	4.0 กรัม
น้ำกลั่น	95 มิลลิลิตร
เลือดแกะ	5.0 มิลลิลิตร

นำ Blood agar base ผสมกับน้ำกลั่นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอจนอาหารอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียสจึงเติมเลือดแกะ

ภาคผนวก ข

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์

1. *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (1-4-1) ความยาวของ Sequence 1407 bp
 TGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
 TTAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGCTGA
 AAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAA
 GGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTT
 TCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC
 CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTG
 GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGG
 AAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
 AGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA
 GGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGTTTTCCGCCCTCAGTGC
 CGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
 CCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTTT
 GATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTC
 TAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGTAATCTCTTAAAGCCATT
 CTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG
 CGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGAACACCCGAAGCCGGTG
 GCGTAACCCTTTTAGGGAGCG

2. *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (16-1/1) ความยาวของ Sequence 1413 bp
 TTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
 AACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCACA
 TGGTTCTTGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT
 GAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTCGTAACACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGG
 CAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTA
 AGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAA
 GAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGG

CGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCGCAGCTAAC
 GCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTT
 GATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAG
 TTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAA
 GCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCG
 CTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC
 CATGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAG

3. *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (16-1/2) ความยาวของ Sequence 1493 bp
 TTCACCCTAATCATTGTCCACCTTAGACGGCTCGCTCCCTAAAAGGGTTACGCCACCGGCTTCGGG
 TGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCGTGC
 TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTACGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAAT
 GGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTA
 GCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGT
 CTTACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
 CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTTGCCCCGAAGGGGAAACC
 TGATCTCTCAGGTGATCAAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACCAC
 ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAG
 GCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCATTATCGT
 TTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTA
 CAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGA
 GTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCCTCGGTTAAGCCGAGGGCT
 TTCACATCAGACTTAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACC
 TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGACA
 ACAGTTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACG
 CGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTG
 GGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAG
 CCATTACCTACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCA
 GCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTA
 AGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCACTCGTTCCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCAC
 CGATCATCAACGAGAACTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCACGCCCGCCAGCGTTCA

4. *Limosilactobacillus fermentum* (16-1/3) ความยาวของ Sequence 1398 bp

TGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAG
 TAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAAGCGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACA
 ACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGC
 ATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGG
 CCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGG
 CGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAA
 GAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTACATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAGTCACGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGC
 AGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAA
 CTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACA
 CCAGTGGCGAAGGCGGTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAG
 TGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACCGAAGAACCTTACCAGGT
 CTTGACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATG
 GTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGT
 TGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT
 CAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAA
 CTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAC
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
 CCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGT

5. *Limosilactobacillus fermentum* (16-1/4) ความยาวของ Sequence 1406 bp

GAACCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAAGCGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACC
 GCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCT
 GCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGAC
 TGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCA
 CAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT
 TGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTACATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAGTCACGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGA
 GAGTGCAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACT
 GGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGA

AGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCC
CTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTTCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGG
TGCATGGTCGTCTGCTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTT
ACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
CGACGTCAGATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGT
CGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGC
CTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTACACCCATGAGAGTTTTGTAACACCCAAAGT

6. *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (16-2-1) ความยาวของ Sequence 1420 bp
GAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCA
AGAACCGCATGGTTCTTGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTCCACAATGGACGCA
AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCCGGTCTGTAACCTCTGTTGTTGGAGAAG
AATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTG
AGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAG
TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCC
GCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTTCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCC
AGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
TCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCG
CGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAG
TCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCCATGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCG

เอกสารนี้เป็นที่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. *Pediococcus pentosaceus* (16-2/2) ความยาวของ Sequence 1413 bp

TCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAAGTGAGTGG
 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
 TACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGAC
 CCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
 CACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCT
 GTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
 AGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAA
 ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
 GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCC
 GCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC
 AAAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCT
 TATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAC
 GAGTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAAC
 TCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
 CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGCCGG

8. *Enterococcus hirae* (20-6) ความยาวของ Sequence 1353 bp

GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTG
 CTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGG
 ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACC
 TGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTA
 AAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG
 GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCA
 TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG

ATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCG
 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGG
 GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGTTCCTCCCTCGGGGGCAAAGT
 GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
 AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGT
 ACAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
 GCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGG

9. *Limosilactobacillus fermentum* (20-9) ความยาวของ Sequence 1405 bp

GATTGATGGTGCCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA
 GTAACCTGCCAGAAAGCGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTCC
 CATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGT
 GGTGGGGTAAACGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGA
 CTGAGACACGGCCCTACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGA
 TGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAGAAGAACACGT
 ATGAGAGTAACTGTTACATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAAGTCACGGTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTC
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAG
 AAGAGGGTAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGCGGAA
 GGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
 TGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTA
 ACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTT
 GCGCCAACCCCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATT
 AGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCAT
 GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGC
 AAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAAT
 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC
 ACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

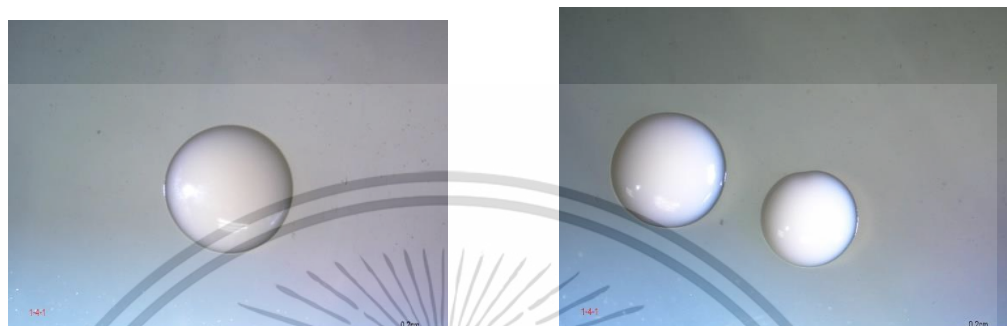
10. *Enterococcus hirae* (21-7) ความยาว Sequence 1354 bp

TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAACAGGTGC
 TAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT
 GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTG
 AGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
 TCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAA
 ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAG
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
 CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
 TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 TATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGT
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGG
 TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAA
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTG
 ACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAA
 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
 GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTA
 CAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
 CAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTA

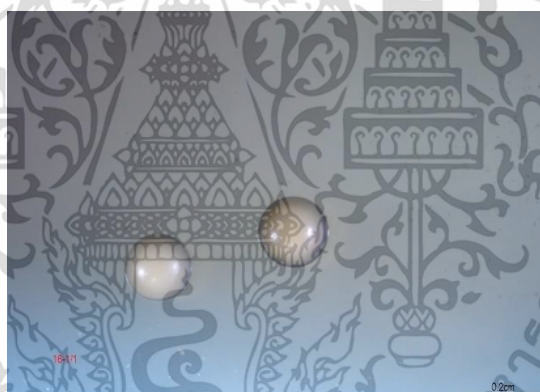
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

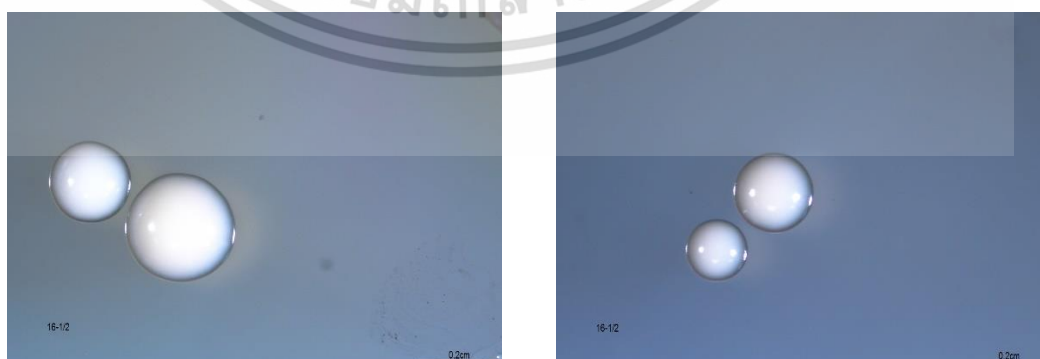
ภาพลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียภายใต้กล้องสเตอริโอสโคป (Stereoscope)



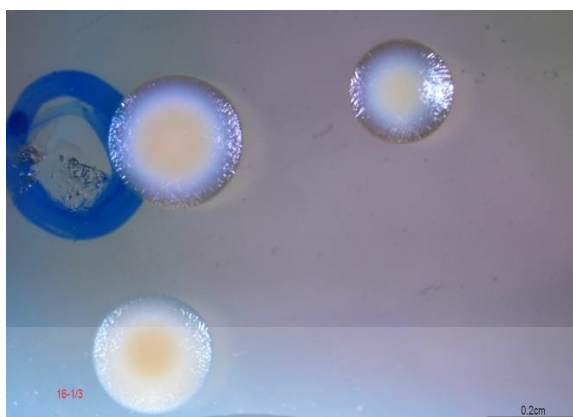
รูปที่ 1 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 1-4-1



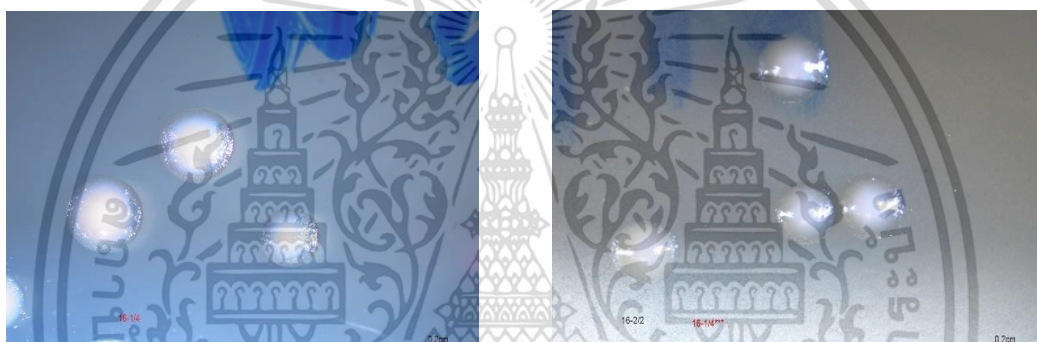
รูปที่ 2 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 16-1/1



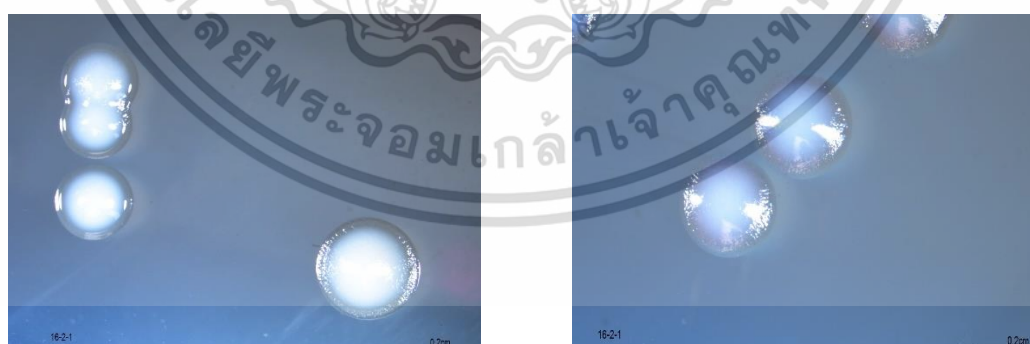
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ **รูปที่ 3** ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 16-1/2 ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 16-1/3



รูปที่ 5 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 16-1/4

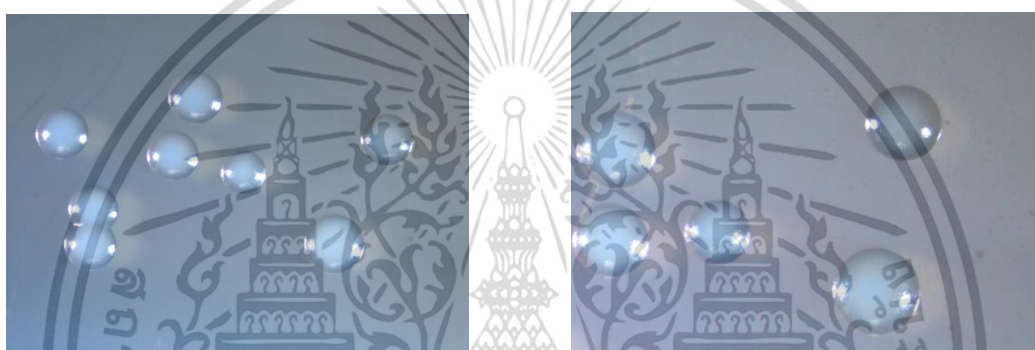


รูปที่ 6 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 16-2-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 16-2/2

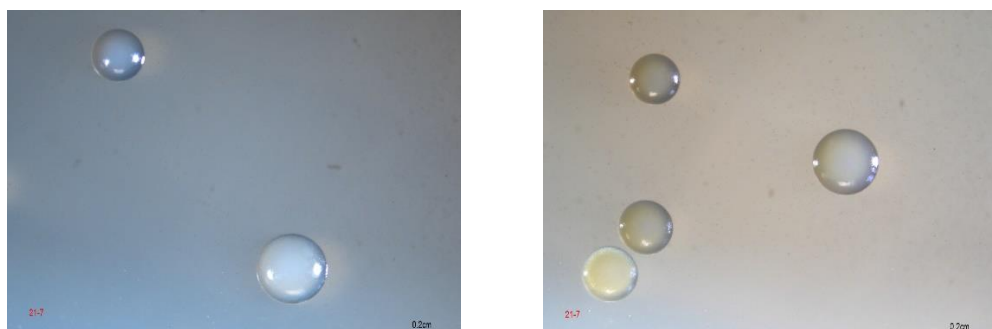


รูปที่ 8 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 20-6



รูปที่ 9 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 20-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



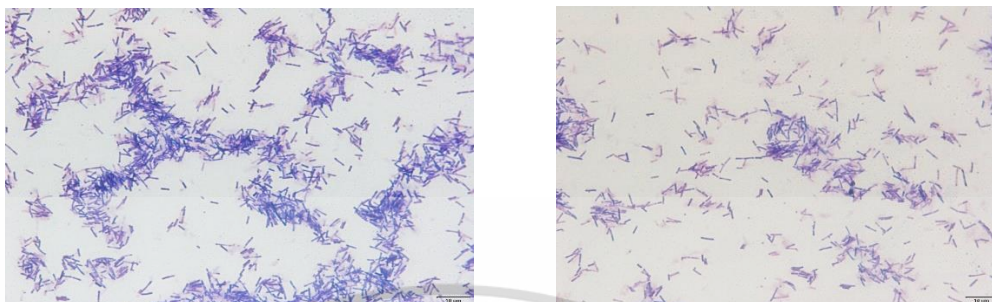
รูปที่ 10 ภาพโคโลนีของเชื้อ รหัส 21-7



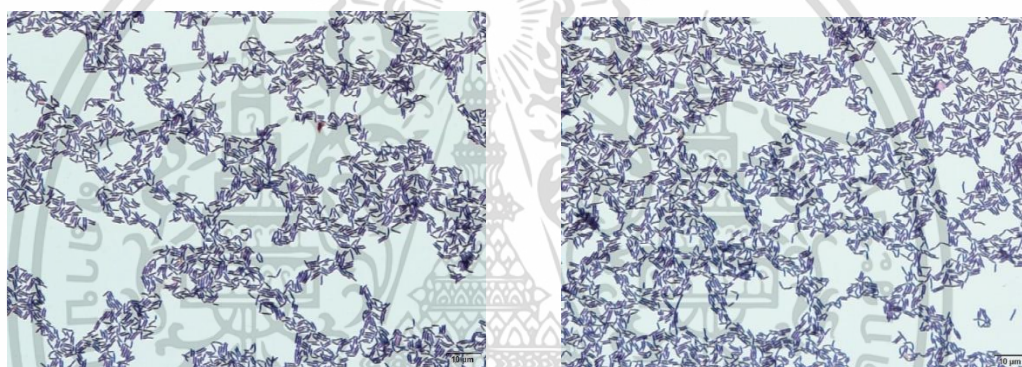
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

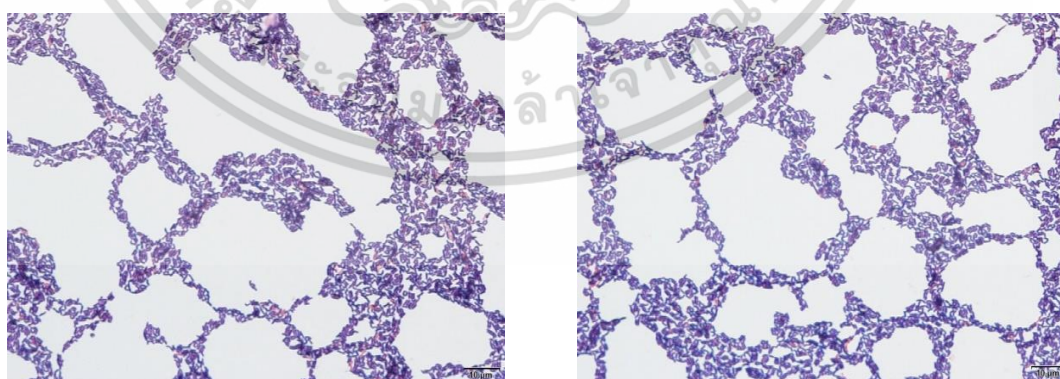
ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 1 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 1-4-1

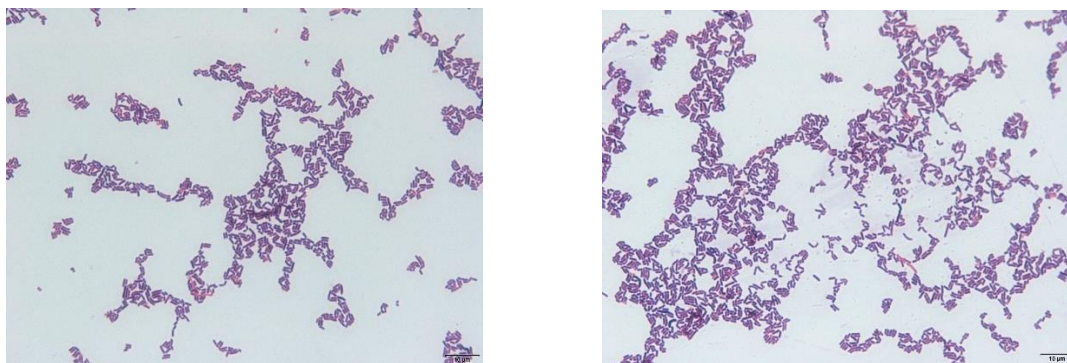


รูปที่ 2 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 16-1/1



รูปที่ 3 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 16-1/2

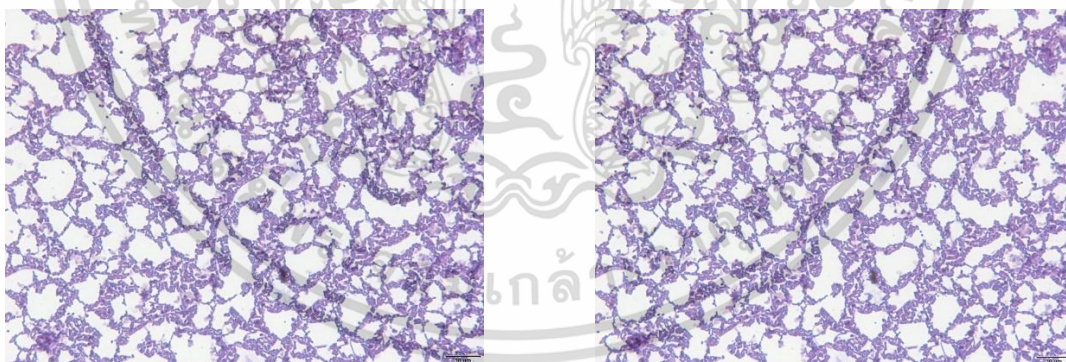
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 16-1/3

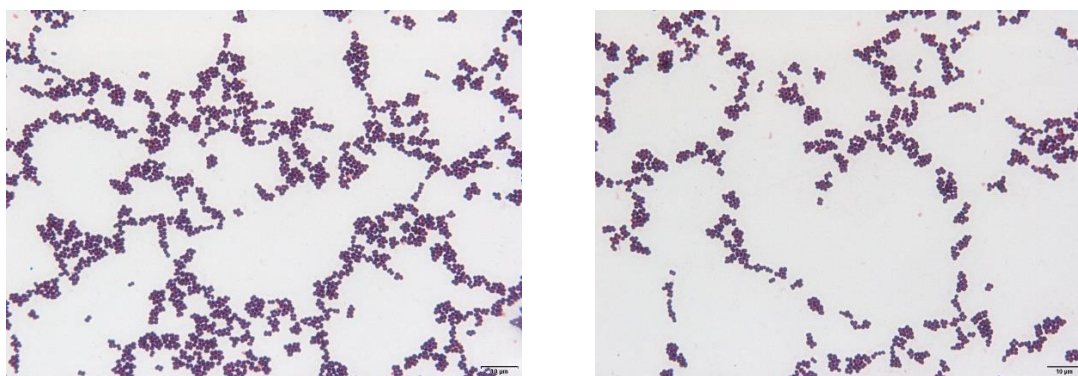


รูปที่ 5 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 16-1/4



รูปที่ 6 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 16-2-1

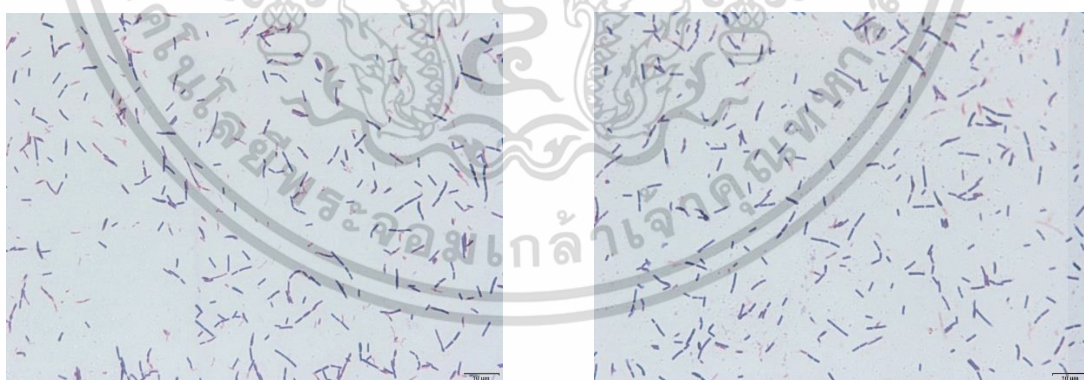
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 16-2/2

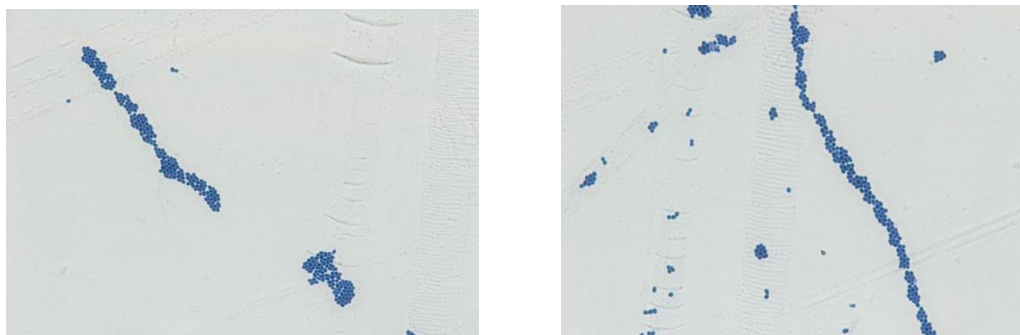


รูปที่ 8 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 20-6



รูปที่ 9 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 20-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 ภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รหัส 21-7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้