การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสและการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นโพรไบโอติก

Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential

ณัฐนนท์ บุณยะกมล
ณัฐวิภา บุตรโพธิ์
ศตวรรษ แฝงมนต์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสและการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นโพรไบโอติก

Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential

ณัฐนนท์ บุณยะกมล

ณัฐวิภา บุตรโพธิ์

ศตวรรษ แฝงมนต์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential

Nutanon Boonyakamon

Nutvipa Buthpho

Satawat Faengmon

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

ชื่อโครงงานพิเศษ การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสและการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นโพรไบโอติก

Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential

เสนอโดย นายณัฐนนท์ บุณยะกมล รหัสนักศึกษา 57050827

นางสาวณัฐวิภา บุตรโพธิ์ รหัสนักศึกษา 57050828

นายศตวรรษ แฝงมนต์ รหัสนักศึกษา 57050895

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงงานพิเศษ การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสและการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นโพรไบโอติก
Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential

เสนอโดย นายณัฐนนท์ บุณยะกมล รหัสนักศึกษา 57050827
นางสาวณัฐวิภา บุตรโพธิ์ รหัสนักศึกษา 57050828
นายศตวรรษ แฝงมนต์ รหัสนักศึกษา 57050895

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2560
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส 2 สายพันธุ์คือ เสาวรสพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis Sims* f. *edulis*) และ เสาวรสพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulus* f. *flavicarpa Degener*) เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง การเรียงตัว การติดสีแกรม ความต้องการอากาศในการเจริญ และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเสาวรสทั้ง 2 สายพันธุ์จำนวน 22 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อที่คัดแยกได้ออกเป็น 6 กลุ่ม และเมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องของเชื้อที่เป็นตัวแทนจากทั้ง 6 กลุ่มได้แก่ Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 พบว่าเชื้อทั้งหมดสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 2% w/v ได้ ในขณะที่เมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่ pH 3 พบว่ามีเพียงเชื้อไอโซเลท L5.1 เท่านั้นที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Cross streak และ Agar well diffusion และพบว่ามีเพียงเชื้อไอโซเลท Y14.1 และ Y10.1 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้เมื่อทำกรทดสอบด้วยวิธี Cross streak

คำสำคัญ: แบคทีเรียเอนโดไฟท์ โพรไบโอติก เสาวรส

Title	Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential		
Students	Mr. Nutanon Boonyakamon	Student ID	57050827
	Miss Nutvipa Buthpho	Student ID	57050828
	Mr. Satawat Faengmon	Student ID	57050895
Degree	Bachelor of Science (Industry Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Dr.Karn Wongsariya		

Abstract

This research aims to isolates endophytic bacteria from 2 strains of passion fruit, purple strain (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) and yellow strain (*Passiflora edulus* f. *flavicarpa* Degener) in order to study their probiotic properties. According to the results of morphological study, shape, arrangement, Gram-staining, oxygen requirement, and biochemical characteristics be able to separate the isolated endophytic bacteria into 6 groups, and after that the 7 representative isolates from 6 groups, Y14.1, Y5.1, Y10.1, L5.1, L6.1, N1.1, and Y1.1. are assigned to determine their probiotic properties. The results show that all 7 isolates can resistance to bile salt at concentration of 2% (w/v), while only L5.1 cannot survive under acidic condition at pH 3. However, the culture supernatants from all 7 isolates do not exhibit antibacterial activity against the growth of *Enterobacter aerogenes* and *Listeria monocytogenes* in Agar well diffusion assay. The antibacterial activity against the growth of *Escherichia coli* is detected from Y14.1 and Y10.1 in Cross streak assay.

Key word: Endophytic bacteria , Probiotic , Passion fruit

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยคณะผู้จัดทำต้องขอขอบคุณ อ.ดร. กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำปรึกษาชี้ข้อบกพร่องและให้คำแนะนำในการแก้ไข ให้กำลังใจและสนับสนุนอุปกรณ์สำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือ งบประมาณและสถานที่ในการศึกษาทดลองและบุคลากรของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อน พี่ น้องรวมไปถึงบุคคลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทดลองในครั้งนี้ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนกลุ่มของข้าพเจ้าจนโครงงานพิเศษนี้เสร็จสิ้นลุล่วงไปด้วยดี

ณัฐนนท์ บุณยะกมล

ณัฐวิภา บุตรโพธิ์

ศตวรรษ แฝงมนต์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
Abstract ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูปภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 โพรไบโอติก 3
2.1.1 คุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก 3
2.1.2 ประโยชน์จากโพรไบโอติกต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) 5
2.2 เสาวรส 6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 9
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 9
3.1.1 อุปกรณ์ 9
3.1.2 สารเคมี 9
3.1.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 10
3.1.4 ตัวอย่างเสาวรส 10
3.2 วิธีการทดลอง 10
3.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อ 10
3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส 10
3.2.3 การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 11
3.2.3.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม 11
3.2.3.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส (catalase test) 11
3.2.3.3 การทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 11
3.2.3.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส 12
3.2.4 การทดสอบความสามารถเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น 12
3.2.4.1 การทนกรด 12
3.2.4.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt) 13

3.2.4.3 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการCross streak method 13
3.2.4.4 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการAgar well diffusion 14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 15
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากผลเสาวรส 15
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 15
4.3 ปฏิกิริยาทางชีวเคมี 17
4.3.1 การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test) 17
4.3.2 ทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อ (Sugar Fermentation) 17
4.3.3 ทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส (Gelatin Hydrolysis) 18
4.4 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น 21
4.4.1 ความสามารถในการทนกรด 21
4.4.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt) 21
4.4.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 24
5.1 สรุปผลการวิจัย 24
5.2 ข้อเสนอแนะ 24
เอกสารอ้างอิง 26
ภาคผนวก 30
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 31
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 35
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น 38

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 การแปลผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรด แก๊ส ไฮโดรเจนซัลไฟด์
จากการหมักน้ำตาลในอาหาร Triple sugar iron agar (TSI).....12
4.1 แสดงจำนวนไอโซเลทที่แยกได้จากเสาวรส 2 สายพันธุ์.....15
4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร BHI.....16
4.3 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส.....19
4.4 แสดงไอโซเลทของแต่ละกลุ่มที่คัดเลือกไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้น.....20
4.5 แสดงความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส.....22
4.6 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส.....23

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

1 แสดงลักษณะการขีดเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (เส้น A) และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (เส้น B) ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการ Cross streak method.....13

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบัน โพรไบโอติก เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย เนื่องด้วยคุณประโยชน์ที่มีต่อมนุษย์และสัตว์จึงทำให้มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับโพรไบโอติกมากขึ้นเพื่อที่จะค้นหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีเชื้อโพรไบโอติกอยู่และค้นหาสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อโพรไบโอติก โดยคำว่า “โพรไบโอติก” ตามคำจำกัดความจากองค์การด้านอาหารและเกษตรของสหรัฐอเมริกา (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization : FAO/WHO) คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ให้ประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) เมื่อได้รับในปริมาณที่มากพอ ซึ่งประโยชน์ที่ได้รับจะเกี่ยวข้องกับสุขภาพของระบบทางเดินอาหารเป็นหลัก และเป็นผลต่อเนื่องไปยังการส่งเสริมสุขภาพด้านอื่นๆ ให้ดีขึ้น เช่นช่วยในการทำงานของทางเดินอาหารส่วนลำไส้ใหญ่ ช่วยให้ขับถ่ายได้ดีขึ้น ลดอาการท้องผูก ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสและช่วยในการปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ เป็นต้น ทั้งนี้โพรไบโอติกจะมีประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นจากโพรไบโอติกจะเกิดขึ้นต่อเมื่อต้องได้รับโพรไบโอติกในปริมาณที่เพียงพอคือ ไม่ต่ำกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและต้องเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วย การเสริมโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผู้โบริโภคได้รับโพรไบโอติกในปริมาณที่เพียงพอที่จะเกิดประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) ได้ ฉะนั้นการคัดแยกโพรไบโอติกจากแหล่งธรรมชาติเพื่อนำไปส่วนผสมในผลิตภัณฑ์จึงเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่ง หากเป็นโพรไบโอติกที่สามารถคัดแยกได้จากผลไม้เมื่อนำไปผสมลงในผลิตภัณฑ์ก็จะได้ทั้งโพรไบโอติก รสชาติและสารอาหารอื่นอีกด้วย โดยปกติโพรไบโอติกจะถูกผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกนมเปรี้ยว โยเกิร์ตและอาหารหมัก อีกทั้งยังพบในผลไม้เช่น มะม่วง และสตอเบอร์รี่ เป็นต้น (Ram Kumar Pundir., *et al*., 2013) เมื่อกล่าวถึงผลไม้เพื่อสุขภาพนั้น เสาวรสถือเป็นผลไม้ที่อร่อยและมีคุณค่าทางโภชนาการเนื่องจากมีคุณสมบัติที่โดดเด่นเช่น มีสารต้านอนุมูลอิสระ ให้วิตามินซีและเอในปริมาณสูง ช่วยในการนอนหลับและช่วยในการขับถ่าย รสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมแต่ก็สามารถรับประทานผลสดได้ และยังพบแร่ธาตุต่างๆในเสาวรส เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น ด้วยคุณประโยชน์ข้างต้นของเสาวรสโดยเฉพาะคุณสมบัติที่ช่วยในการขับถ่าย จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ซึ่งคาดว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการกระตุ้นการขับถ่ายของเสาวรส จึงได้ศึกษาและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส 2 สายพันธุ์คือพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) และพันธ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*) จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ แล้วนำไปทดสอบความสามารถการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นคือ ทดสอบความทนต่อกรด ทดสอบความทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt) และ การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์

1) เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส

2) เพื่อทดสอบความสามารถเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเสาวรส 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เสาวรสพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*) และเสาวรสพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง BHI การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์คะตาเลส การสร้างเอนไซม์เจลาติเนสและทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลของเชื้อ จากนั้นทำการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อคัดเลือกนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการทนกรด การทนต่อเกลือน้ำดีและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงวิธีการคัดแยกการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเสาวรส

2) สามารถทราบถึงคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเสาวรสได้

3) สามารถนำผลการวิจัยที่ได้ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในระดับสูงขึ้นต่อไปได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โพรไบโอติก

โพรไบโอติกค้นพบมาตั้งแต่ต้นปี ค.ศ. 1900 โดย Elie Metchnikoff นักวิทยาศาสตร์รางวัลโนเบลชาวรัสเซีย ได้ศึกษาและค้นคว้าเกี่ยวกับประชากรชาวบัลกาเรียที่บริโภคนมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ต ซึ่งมีแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นประจำ จะมีสุขภาพดี แข็งแรงและอายุยืน ซึ่งจุลินทรีย์ที่ได้รับเข้าไปจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายโดยลดสารที่เป็นพิษจากอาหารและสารที่เกิดจากเชื้อก่อโรค (Pathogen) หรือเชื้อที่ไม่ดีในลำไส้ และมีการศึกษาภายหลังพบว่าจุลินทรีย์ชนิดที่พบนั้นคือ *Lactobacillus bulgaricus* ต่อมาแพทย์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Minoru Shirota เห็นความสำคัญของการป้องกันโรค และการปรับสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ได้ศึกษาค้นคว้าจนสามารถคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* จากลำไส้ของมนุษย์ได้สำเร็จ ซึ่งแบคทีเรียชนิด *L. casei* สายพันธุ์ Shirota นี้ได้นำมาผสมในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว (Yakult Central Institute for Microbiological Research., 1998) ในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากขึ้น ทั้งในด้านสายพันธุ์และคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก (Stanton., *et al*, 2001) ในส่วนผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีหลายรูปแบบ เช่น ผสมในนม นมเปรี้ยว โยเกิร์ต หรืออาหารเสริมแคปซูล เป็นต้น และยังสามารถพบเชื้อโพรไบโอติกได้ในอาหารหมักดองและผลไม้ทั่วไปอีกด้วย (Ram Kumar Pundir., *et al*., 2013)

คำว่าโพรไบโอติก (Probiotic) มีหลายคำจำกัดความและมีการปรับเปลี่ยนมาเรื่อยๆ จนคณะทำงานของ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) และ World Health Organization (WHO) ได้กำหนดคำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายผู้เป็นเจ้าของ เมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม (FAO/WHO, 2002) ซึ่งถือเป็นคำจำกัดความที่เป็นทางการ เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในวงการวิทยาศาสตร์

2.1.1 คุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก

1) จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกต้องผ่านการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย (GRAS = Generally Recognized As Safe) ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ปลอดภัยต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Salminen., *et al*., 2000)

1.1) แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องเป็นแหล่งที่มีความปลอดภัย เมื่อตรวจสอบสกุล (genus) และสายพันธุ์ (species) ของจุลินทรีย์ในเบื้องต้นต้องพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย

1.2) เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ

1.3) มีคุณสมบัติยึดเกาะภายในระบบทางเดินอาหาร

1.4) มีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลหรือสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host)

2) สามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดี (Bile salt) ภายในระบบทางเดินอาหารของ สิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) รวมทั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ เพราะต้องเดินทางผ่านระบบทางเดินอาหาร สภาวะแวดล้อมแรกที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกคือกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรด (Lankaputhra and Shah., 1995) และการหลั่งน้ำดีที่สร้างจากตับแล้วเก็บไว้ที่ถุงน้ำดีสู่ลำไส้เล็กสามารถทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไลปิดและกรดไขมันได้ ดังนั้นโพรไบโอติกจึงจำเป็นต้องสามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดี (Bile salt) ในทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) ได้ ความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ จากการศึกษาของ Suskovae และคณะ (2000) พบว่าเมื่อรูปร่างโคโลนีและโครงสร้างของ *Lactobacillus acidophilus* M92 เป็นแบบเรียบ (smooth, S) จะสามารถทนต่อน้ำดีได้สูงกว่าแบบหยัก (rough, R) เพราะโคโลนีแบบหยักจะมีช่องว่างของผนังเซลล์มาก ทำให้น้ำดีสามารถเข้าไปทำอันตรายต่อตัวเซลล์ได้มากกว่าแบบเรียบ นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นเกลือน้ำดีโซเดียมทอโรคอเลต (sodium taurocholate) มาก *L. acidophilus* M92 จะผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase, BSH) มาก จึงสามารถทนต่อน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงได้ จากการศึกษาพบว่าเกลือน้ำดีที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดของมนุษย์ที่มีระดับคลอเรสเตอรอลสูงและช่วยป้องกันภาวะการมีระดับคลอเรสเตอรอลสูงในมนุษย์ปกติ (Smet., *et al*., 1994) เนื่องจากการผลิตน้ำดีในตับของมนุษย์และสัตว์ใช้คลอเรสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โพรไบโอติกที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (BSH) ทำให้เกิด free bile salt และ cholic acid ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมีการดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ต่ำ ส่งผลให้มีการใช้คลอเรสเตอรอลเพื่อสร้าง free bile salt และ cholic acid เพิ่มมากขึ้นในตับ ทำให้ระดับคลอเรสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง

3) สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ใหญ่ของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) และสามารถแย่งการยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่กับจุลินทรีย์ก่อโรค การเกาะของจุลินทรีย์กับผนังลำไส้ของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) เป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องจากการเกาะกับลำไส้ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้และเจริญได้ภายในระบบทางเดินอาหาร (Reid., *et.al*., 2002) จากการศึกษาการแข่งขันการยึดเกาะผนังลำไส้ของมนุษย์ ระหว่าง *Lactobacillus rhamnosus* GG กับ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 พบว่า *L. rhamnosus* และ *S. enterica* serovar Typhimurium มีบริเวณที่เกาะกับผนังลำไส้แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม *L. rhamnosus* สามารถลดการยึดเกาะของ *S. enterica* serovar Typhimurium กับผนังลำไส้ได้ การยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคนี้อาจจะเป็นผลมาจากค่าความเป็นกรดเบสที่ลดลงภายในลำไส้ มากกว่าเกิดจากตัวเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยตรง (Lehto and salminen., 1997)

4) ผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) เช่น สารต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ (Organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide) ไดอะซิติล (Diacetyl) สารต้านจุลินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำ อะซิตาลดิไฮด์ (Acetaldehyde) และแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นต้น (Ouwehand., 1998 ; สุพรรณิการ์., 2548) บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสารอาหารบาง

ชนิดได้ เช่น β - galactosidase และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์กาแลกโตซิเดส (galactosidase) ในการช่วยย่อยน้ำตาลกาแลกโตสในน้ำนมหรือลดการทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น กลูคูโรนิเดส (glucuronidase) และ อะโซรีดักเทส (azoreductase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นสารก่อมะเร็ง (Rowland., 1992)

5) การป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรค และช่วยเพิ่มระดับของภูมิคุ้มกันจากการยึดเกาะผนังลำไส้ของโพรไบโอติกที่ไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ที่แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และถัดมาจนเกือบถึงชั้นของกล้ามเนื้อ (Mardara., 1997) โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้โดยโพรไบโอติกหรือชิ้นส่วนโพรไบโอติก หรือสารแมตาบอไลต์ที่โพรไบโอติกสร้างขึ้น เรียกสิ่งเหล่านี้ว่า แอนติเจน เมื่อแอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิว เป็น M-cells (Laissue., *et al*., 1993) M-cells สามารถรับแอนติเจนเข้ามาโดยตรง หรือ ผ่านเข้ามาทางที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว (tight junctions) เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโพรไบโอติกยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้โดยตรง เช่น เพิ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของ Host กระตุ้นการดูดซึมแอนติเจนของสัตว์และผลิตสารช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน เช่น อินเตอเฟอรอน (interferon) เป็นต้น (Ouwehand., *et al*., 1999)

6) มีความคงตัวสูงโดยต้องสามารถที่จะมีชีวิตอยู่รอดจากการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและเก็บรักษาได้นาน

2.1.2 ประโยชน์จากโพรไบโอติกต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host)

โพรไบโอติกมีผลต่อการทำงานด้านต่าง ๆ ภายในทางเดินอาหาร เช่น การย่อย การดูดซึมและการบีบตัวของทางเดินอาหาร บทบาทที่สำคัญคือ การหมัก ซึ่งจะให้ผลเป็นกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acids, SCFA) ประกอบด้วย กรดไขมันที่ไม่ระเหย (Non-volatile fatty acids) ได้แก่ พวก แลคเตต (Lactate) และกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acids) ได้แก่ อะซิเตท (acetate) บิวทิเรท (butyrate) โพรพริโอเนท (proprionate) และแอลกอฮอล์ (alcohol) โดยเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ต้องใช้ volatile SCFA เป็นตัวให้กำลังงาน เพื่อทำหน้าที่ดูดซึมน้ำ และ เกลือแร่จากของเหลวภายในโพรงลำไส้ จุลินทรีย์บางชนิดจะทำให้อาหารอยู่ในทางเดินอาหารสั้นและลดผลย่อยบางชนิดที่อาจเป็นสารกระตุ้นให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ มีการศึกษาและพบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติก จะสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ (Kaila., *et.al*., 1995 ; Simakachorn., *et.al*., 2000) เชื้อที่เกาะจับที่ผิวเซลล์นี้จะปล่อยสารออกมากระตุ้นเซลล์เยื่อบุ ซึ่งมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ได้ เช่น สารจำพวก Lipopolysaccharides (LPS) จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์เยื่อบุในการสร้างเยื่อเมือกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการตอบสนองต่อวัคซีนและเชื้อโรค ช่วยกระตุ้นเยื่อบุลำไส้ให้เจริญเติบโตและช่วยรักษาการอักเสบต่าง ๆ มีการศึกษาวิจัยของโพรไบโอติกกับสุขภาพ มีหลากหลายประโยชน์เช่น

1) การรักษาและป้องกันโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรตาพบว่าใช้เชื้อ *Lactobacillus* sp. รักษาโรคอุจจาระร่วงสามารถทำให้หายเร็วขึ้นประมาณ 1 วัน (Huang., *et.al*., 2002 ; Van Neil., *et.al*., 2002) การศึกษาในสหรัฐอเมริกา (Saavedra., *et.al*., 1994) แสดงให้เห็นว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสโรตาในโรงพยาบาลได้ สำหรับในประเทศไทยเด็กที่กินนมเสริม *Bifidobacteria bifidum* และ *Streptococcus thermophilus* สามารถลดการติดเชื้อไวรัสโรตาได้

(Phuapradit., *et.al*., 1999) ซึ่งอาจเป็นผลจากการกระตุ้นกลไกของภูมิคุ้มกันที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ การศึกษาจะเห็นผลเฉพาะในด้านการป้องกันการเกิดอุจจาระร่วงจากเชื้อไวรัสโรตาแต่ยังไม่มีการศึกษาด้านผลการรักษา

2) ผลในการลดความดันโลหิต ปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจกับเชื้อ *Lactobacillus helveticus* พบว่านมที่หมักด้วย *L. helveticus* มีสารแลคโตไตรเปปไทด์คือ เปปไทด์ที่พบในนมเปรี้ยว มี 2 ชนิด ได้แก่ valine-prolineproline (VPP) และ isoleucine-proline-proline (IPP) ซึ่งเกิดจากโปรตีนเคซีนในนมที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ *L. helveticus* (Nakamura., *et.al*., 1995 ; Turpeinen., *et.al*., 2011) มีการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพที่พบว่าโพรไบโอติกมีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิตโดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme (ACE inhibitor) ส่งผลให้ความดันโลหิตลดลง (Nakamura., *et.al*., 1995 ; Masuda., *et.al*., 1996 ; Nakamura., *et.al*., 1996) รายงานจากงานวิจัยกว่า 20 ชิ้นพบว่าการบริโภคแลคโตไตรเปปไทด์ปริมาณตั้งแต่ 2 มก. ขึ้นไปทุกวันช่วยลดความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว 4 mmHg และช่วยลดความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว 1.9 mmHg ในผู้ที่มีความดันโลหิตสูงไม่มาก (Turpeinen., *et.al*., 2013) ดังนั้นการบริโภคนมเปรี้ยวจึงมีศักยภาพในการช่วยควบคุมความดันโลหิตและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ที่มีความดันโลหิตสูงได้ (Jauhiainen., *et.al*., 2012)

3) โพรไบโอติกช่วยลดผลข้างเคียงของอาการอุจจาระร่วงจากการได้รับยาปฏิชีวนะ การศึกษาในสหรัฐอเมริกา (Vanderhoof., *et.al*., 1999) และฟินแลนด์ (Arvola., *et.al*., 1999) พบว่าเชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus rhamnosus* LGG จะลดการเกิดอุจจาระร่วงลงประมาณ 2 ใน 3 ของเด็กที่ได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ

2.2 เสาวรส

เสาวรส (Passion fruit) เป็นไม้เถาที่อยู่ในตระกูล *Passifloraceae* มีถิ่นกำเนิดจากเขตร้อนพื้นที่สูงในอเมริกาใต้ เสาวรสที่ปลูกเป็นการค้าโดยทั่วไปมี 2 ชนิดคือ เสาวรสพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*) และเสาวรสพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) โดยพันธุ์สีเหลืองมีผลขนาดใหญ่กว่าและมีความแข็งแรงทนทานต่อโรคต้นเน่า เถาเหี่ยว ไวรัส และไส้เดือนฝอยมากกว่าพันธุ์สีม่วง แต่พันธุ์สีม่วงมีปริมาณกรดที่น้อยกว่า มีกลิ่นหอมรสชาติหวานอมเปรี้ยว สำหรับประเทศไทยนำเสาวรสเข้ามาปลูกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2498 โดยเป็นพันธุ์สีม่วง ต่อมามีผู้นำเข้ามาปลูกในหลายพื้นที่ทั้งพันธุ์สีม่วงและพันธุ์สีเหลือง และได้ปลูกเป็นการค้าโดยส่วนใหญ่เป็นพันธุ์สีเหลืองเพื่อส่งโรงงานแปรรูป แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย น่าน เพชรบูรณ์ ระยอง ตราด ปราจีนบุรี บุรีรัมย์ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี ชุมพร นราธิวาส และสุราษฎร์ธานี (อัจฉราและคณะ., 2557)

เสาวรสพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*) เสาวรสชนิดนี้ผิวผลจะมีสีม่วงเมื่อผลแก่ ผลมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ ผลสุกมีรสหวานและกลิ่นหอมกว่าเสาวรสพันธุ์สีเหลือง แต่ผลมักจะมีขนาดเล็กกว่า คือมีเส้นผ่าศูนย์กลางผลประมาณ 4-5 เซนติเมตร และน้ำหนักประมาณ 50-60 กรัมต่อผลเสาวรสพันธุ์สีม่วงที่ปลูกในประเทศไทยนั้นมีทั้งพันธุ์สำหรับแปรรูป และพันธุ์สำหรับรับประทานผลที่มีรสชาติหวานกว่า มีความหวาน 17-18 Brix นอกจากนี้ยังมีเปลือกผลไม่บางเกินไปทำให้ยืดอายุการวางจำหน่ายนานขึ้น (อัจฉราและคณะ., 2557)

เสาวรสพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) ลักษณะผิวผลเมื่อแก่จะมีสีเหลือง มีขนาดผลใหญ่กว่าชนิดผลสีม่วง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 80-120 กรัม เนื้อในให้ความเป็นกรดสูงกว่าชนิดผลสีม่วงจึงมีรสเปรี้ยวมาก และนิยมใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูป ทำน้ำผลไม้ เพราะต้นมีความทนทานต่อโรคต้นเน่าเถาเหี่ยว โรคไวรัส และไส้เดือนฝอยมากกว่าพันธุ์สีม่วง จึงนิยมใช้เป็นต้นตอสำหรับเปลี่ยนพันธุ์เป็นเสาวรสหวาน (ศุภวัชรและคณะ., 2556)

เนื้อเสาวรสทั้งสองชนิดอุดมไปด้วยสารสำคัญรวมทั้งวิตามินต่างๆ นิยมนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้ และมีการศึกษาในผู้สูงอายุทั้งเพศหญิงและชายที่มีสุขภาพดี ให้ดื่มน้ำเสาวรสทั้งพันธุ์สีม่วงและพันธุ์สีเหลืองวันละ 1 แก้ว ปริมาตรประมาณ 125 มิลลิลิตร ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ พบว่าเสาวรสทั้ง 2 ชนิดมีผลช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ยับยั้งไซโตไคน์ (Cytokine) ที่กระตุ้นให้มีการอักเสบ อย่างไรก็ตามไม่ควรดื่มน้ำเสารสที่มีส่วนผสมของน้ำตาลในปริมาณสูงเกินไป เพราะอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพได้ (ศุภวัชรและคณะ., 2556)

คุณค่าทางโภชนาการของเสาวรสขนาดกลาง 1 ผล ให้คุณค่าสารอาหารทั้งแคลเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินเอ เหล็ก วิตามินซี โซเดียมและแมกนีเซียม ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำเสาวรส ประกอบด้วยน้ำประมาณ 76-85 เปอร์เซ็นต์ ของแข็งประมาณ 17.4 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตประมาณ 12.4 เปอร์เซ็นต์ กรดอินทรีย์ประมาณ 3.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นมีแคโรทีนอยด์ สารประกอบไนโตรเจน สารประกอบที่ให้กลิ่น วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ รวมทั้งเอนไซม์ จากการที่เสาวรสมีวิตามินเอค่อนข้างสูง โดยเฉพาะสารแคโรทีนอยด์ จึงช่วยบำรุงสายตาและผิวพรรณ จากการศึกษาพบว่ามีวิตามินซีค่อนข้างสูง คือ 39.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำเสาวรส ซึ่งมากกว่าที่พบในมะนาวและพบสาร albumin-homologous protein ในเมล็ดของผลเสาวรส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ และยังมีสรรพคุณช่วยแก้อาการนอนไม่หลับ บรรเทาอาการโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ช่วยในการขับถ่าย ลดไขมันในเส้นเลือด กำจัดสารพิษในเลือด บำรุงผิวพรรณ และช่วยฟื้นฟูตับและไตที่อ่อนแอ แต่สำหรับผู้ที่มีปัญหาเรื่องน้ำตาลในเลือดไม่ควรดื่มมาก เพราะน้ำเสาวรสมีน้ำตาลอยู่ในปริมาณสูง โดย Zeraik และคณะ (2011) รายงานว่าผลของเสาวรส *Passiflora edulis* และ *Passiflora alata* และเปลือกของเสาวรส *Passiflora edulis* มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและต้านการอักเสบ โดยทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) พบว่าสารสกัดจากเปลือกของเสาวรสมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดสของเอนไซม์ MPO ได้ดีกว่าสารสกัดจากผลเสาวรส ซึ่งสอดคล้องกับสารฟลาโวนอยด์ที่มีตามธรรมชาติในเปลือกของเสาวรส อีกทั้งยังมีรายงานว่าสารสกัดเสาวรสพันธุ์สีม่วงช่วยลดความดันโลหิตได้ โดยมีส่วนประกอบของ bioflavonoids กรดฟีนอล และ anthocyanins (Zibadi., *et.al*., 2007)

จากการศึกษาของ W. J. Kelly และคณะ (1996) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีรีโอซิน (bacteriocin) จากผัก ผลไม้สด น้ำผลไม้ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์พร้อมทาน ด้วยวิธีการ Spread plate technique บนอาหารแข็ง De Man Rogosa and Sharpe (MRS) พบว่าในน้ำเกรปฟรุตและน้ำส้มพบเชื้อ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งกลุ่มของโพรไบโอติกโดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ความสามารถในการสร้างสารแบคทีรีโอซินก็เป็นหนึ่งในความสามารถการเป็นโพรไบโอติกเช่นกัน จากการศึกษาของ Ram Pundir และคณะ (2013) ที่ศึกษาความสามารถการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารสด ได้ทดสอบความสามารถการเป็นโพรไบโอติกจาก ผักสดเช่นแครอท หัวไชเท้า ขิง มะนาว มะเขือเทศ

ผลไม้สดเช่น ราสเบอร์รี่ แอปเปิ้ล ส้ม โดยพบแบคทีเรียกรดแลคติกถึง 26 ไอโซเลท และมี 8 ไอโซเลท ที่มีความสามารถเป็นโพรไบโอติกได้ และการศึกษาของ Estefânia และคณะ (2016) ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกากผลไม้ที่ได้จากการแปรรูปคือ เชอร์รี่ไทย หรือ อะเซโลร่าเชอร์รี่ มะม่วง ทุเรียนเทศ และ สตอเบอร์รี่ พบแบคทีเรียกรดแลคติกถึง 10 สปีชีย์ ได้แก่ *Lactococcus lactis Pediococcus pentosaceus Leuconostoc mesenteroides Lactobacillus fermentus Lactobacillus nagelii Lactobacillus plantarum Lactobacillus brevis Lactobacillus casei Lactobacillus paracasei* และ *Lactobacillus pentosus* นั้นแสดงให้เห็นว่าในผลไม้สดหรือชิ้นส่วนจากผลไม้สดเช่นเปลือก เมล็ด มีโอกาสพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้มาก เมื่อเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกความน่าจะเป็นที่จะมีความสามารถเป็นโพรไบโอติกก็สูงขึ้นด้วย ด้วยเสาวรสมีรสชาติเปรี้ยว และมีสภาพความเป็นกรด อีกทั้งยังมีคุณประโยชน์ในการช่วยการขับถ่ายได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่ในเสารสอาจมีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหรือแบคทีเรียที่มีความสามารถเป็นโพรไบโอติกที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก

เสาวรสเป็นผลไม้ที่ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างและเป็นพืชที่ปลูกได้ง่าย ให้ผลผลิตต่อไร่สูงเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมแปรรูปในประเทศมากขึ้น จึงเป็นไม้ผลที่อาจทำรายได้ให้แก่เกษตรกรได้ดี เสาวรสนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ทั้งรับประทานสดได้ นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เช่น แยม ไอศกรีม หรือผสมลงในเครื่องดื่มน้ำผลไม้เพื่อเพิ่มกลิ่นหอมและรสชาติ ทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการและยังมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ช่วยในการนอนหลับง่าย ช่วยในการขับถ่าย ถ้าในเสาวรสมีเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถเป็นโพรไบโอติก ก็สามารถนำไปเป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มปริมาณโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าและทางเลือกในการนำเสาวรสไปแปรรูป หรือเป็นทางเลือกใหม่สำหรับผู้ที่แพ้อาหารจำพวกแลคโตส เพราะโพรไบโอติกส่วนใหญ่พบได้ในผลิตภัณฑ์ที่มีแลคโตสเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งแรงดันไอ (Autoclave)
2. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Air flow Laminar)
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)
5. เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง
6. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
7. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)
8. โกร่ง
9. ไมโครปิเปต ขนาด 20 100 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
10. จานเพาะเชื้อ (Petri disc)
11. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. ไม้พันสำลี (Cotton swab)
13. หลอดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
14. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
16. ไมโครเวฟ (Microwave)
17. Anaerobic jar
18. Anaerobic pack ชนิด A
19. ไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรน 0.22 ไมครอน (Syringe Filter Nylon Membrane 0.22 µm)
20. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ หลอดทดลอง กระบอกตวง บีกเกอร์และแท่งแก้ว
21. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) เข็มเขี่ยเชื้อ (Niddle) ปากคีบ (Forcep) และตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.1.2 สารเคมี

1. เอทธิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v) และ 95% (v/v)
2. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)
3. น้ำมันพาราฟิน (Parafin oil)
4. โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (NaClO)
5. สารละลายไฮโดรคลอริค (Hydrochloric) 5 นอร์มอล (HCl 5N)
6. เกลือน้ำดี (Bile Salt)
7. สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crytal violet)
8. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram iodine)

9. สารละลายซาฟรานินโอ (Safranin o)
10. สารละลายนิโกรซิน (Nigrosin)
11. อิมเมอร์ชั่นออย (Immersion oil)
12. แบเรียมคลอไรด์ (Barium chloride : $BaCl_2$)
13. กรดซัลฟิวริค (Sulfuric acid : H_2SO_4)
14. ผงวุ้น (Agar)
15. Brain heart infusion (BHI) broth
16. De man Rogosa and Sharp (MRS) broth
17. Nutrient galatin medium
18. Triple iron sugar agar (TSI)

3.1.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Esherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Listeria monocytogenes*

3.1.4 ตัวอย่างเสาวรส

1. เสาวรสพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*)
2. เสาวรสพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อ

ทำความสะอาดเปลือกผลเสาวรสด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % (v/v) 5 นาที สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (NaClO) 6 % (v/v) 5 นาที แอลกอฮอล์ 70 % (v/v) 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำน้ำกลั่นครั้งสุดท้ายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนหน้าอาหารแข็ง Brain heart infusion agar (BHI) ด้วยเทคนิค spread plates บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Rania Aydi Ben Abdallah., *et.al*., 2016)

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส

ผ่าผลเสาวรสที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วด้วยมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อ นำเมล็ดเสาวรสจำนวน 10-15 เมล็ดใส่ในโกร่งที่ปราศจากเชื้อ บดจนเมล็ดแตกละเอียด ปิเปตของเหลวที่ได้จากการบด 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Brain heart infusion (BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ โดยเทน้ำมันพาราฟิน (Parafin oil) ปิดทับผิวหน้าอาหารเหลวที่ใส่ตัวอย่างแล้ว เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปิเปตตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรลงบนอาหารแข็ง BHI และเกลี่ยให้ทั่วด้วยเทคนิค spread plates นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว เพื่อนำไปทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate บนอาหารแข็ง BHI และนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2.3 การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.2.3.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดน้ำกลั่น 1 หยดลงบนกระจกสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) แตะเชื้อนำมาผสมกับหยดน้ำกลั่นและเกลี่ย (Smear) ทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอย Smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง หยดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % (v/v) เพื่อล้างสี แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลายซาฟรานินโอ ทิ้งไว้ 30 วินาทีล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะการเรียงตัวและการติดสี

3.2.3.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาวางบนสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 % (w/v) ลงบนเชื้อสังเกตการณ์เกิดฟองแก๊สภายในเวลา 1 นาที ถ้าเกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้ (Catalase positive) แต่ถ้าไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสเลสได้ (Catalase negative) หากเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วเกิดฟองแก๊สน้อยและใช้เวลานานกว่า 1 นาที ฟองแก๊สอาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เพอร์รอกซิเดส (Peroxidase) ได้

3.2.3.3 การทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล

การทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสด้วยอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) แทง (Stap) ลงในอาหารในแนวตรงจนเกือบถึงก้นหลอด (Butt) และ Streak เชื้อที่ผิวหน้าอาหารเอียง (Slant) ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic Technique) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยสังเกตจากสีของอาหารเมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ถ่ายเชื้อลงไป บันทึกผลตามตารางที่ 3.1. (K.C. Carroll., *et al.*, 2011)

ตารางที่ 3.1 การแปลผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรด แก๊ส ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) จากการหมักน้ำตาลในอาหาร Triple sugar iron agar (TSI)

ผลการทดสอบในหลอดทดลอง (ส่วนเอียง/ส่วนก้น)	บันทึกผลเป็น	การแปลผล
แดง/เหลือง	K/A	หมักน้ำตาลกลูโคสได้ชนิดเดียว ; สามารถใช้เปปโตนได้
เหลือง/เหลือง	A/A	หมักน้ำตาลกลูโครส และ แลคโตส และหรือ ซูโครส
แดง/แดง	K/K	ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้ ; สามารถใช้เปปโตนได้
แดง/ไม่เปลี่ยนแปลง	K/NC	ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้ ; สามารถใช้เปปโตนในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น
เหลือง/เหลืองมีฟองอากาศ	A/A , G	หมักน้ำตาลกลูโครส และ แลคโตสและหรือ ซูโครส ได้ ; สามารถสร้างแก๊สได้
แดง/เหลืองมีฟองอากาศและจุดดำ	K/A , G , H_2S	หมักน้ำตาลกลูโครสได้ชนิดเดียว ; สามารถสร้างแก๊สได้ ; สามารถสร้าง H_2S
แดง/เหลืองมีจุดดำ	K/A , H_2S	หมักน้ำตาลกลูโครสได้ชนิดเดียว ; สามารถสร้าง H_2S ได้
เหลือง/เหลืองมีจุดดำ	A/A , H_2S	หมักน้ำตาลกลูโครส และ แลคโตสและหรือซูโครส ได้ ; สามารถสร้าง H_2S ได้
ไม่เปลี่ยนสี/ไม่เปลี่ยนสี	NC/NC	ไม่มีการหมักเกิดขึ้น
A = มีการผลิตกรด ; K = มีการทำปฏิกิริยาของด่าง ; G= มีการผลิตแก๊ส ; H_2S = มีการสร้างซัลเฟอร์		

3.2.3.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส

เตรียมอาหาร Nutrient gelatin ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ แทง (Stab) ลงในอาหารในแนวตรงจนเกือบถึงก้นหลอด นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบผลการทดลอง หากอาหารจะไม่แข็งตัวแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์เจลาตินเนสได้ (Positive, +) เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมหลังจากที่แช่ตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว หากอาหารแข็งตัวแสดงว่าไม่สามารถสร้างเอนไซม์เจลาตินเนสได้ (Negative, -)

3.2.4 การทดสอบความสามารถเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น

3.2.4.1 การทนกรด

การทดสอบความสามารถในการทนกรดดัดแปลงมาจากการทดลองของ Hellmig S. เตรียมอาหารเหลว BHI ที่มีพีเอช 3 ใช้สารละลายไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 5 นอร์มอล แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อแรงดันไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว BHI บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้น จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่เตรียมไว้ 100

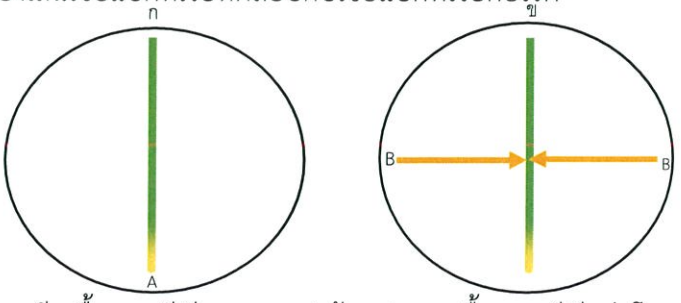
ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลวที่ปรับค่าพีเอชแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรจากหลอดทดสอบลงในอาหารเหลว BHI แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงไป

3.2.4.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt)

การทดสอบความสามารถในการทนกรดดัดแปลงมาจากการทดลองของ Hellmig S. โดยเตรียมอาหารเหลว BHI ที่มีความเข้มข้นเกลือน้ำดี (Bile salt) 2 % (w/v) แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อแรงดันไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว BHI บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้น จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรจากหลอดทดสอบลงในอาหารเหลว BHI แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงไป

3.2.4.3 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการ Cross streak method

เพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิดคือ *Esherichia coli Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 โดยค่า OD ที่ 625 นาโนเมตรต้องอยู่ระหว่าง 0.11 – 0.13 เตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No 0.5 นำลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) แตะเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว 1 ลูป ลากเป็นแนวเส้นตรงบนอาหารแข็ง BHI (ภาพที่ 1 ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) แตะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความขุ่นแล้ว 1 ลูปลากจากขอบจานเพาะเชื้อไปจนชิดเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ภาพที่ 1 ข) หากเชื้อแบคทีเรียทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้จะเกิดวงใส (Clear zone) ระหว่างรอยต่อของเส้นเชื้อแบคทีเรียทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะการขีดเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (เส้น A) และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (เส้น B) ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการ Cross streak method

3.2.4.4 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีการAgar well diffusion

ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion method ได้ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Mounyr Balouiri (2015) โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง BHI ด้วยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีลงอาหารเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใส (Supernatant) ออกมา แล้วนำ Supernatant กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Filtrate) ใส่ Microcentrifuge tube ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปใช้ทำการทดสอบ เทอาหารแข็ง BHI ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 นำมา swab ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง BHI รอจนผิวหน้าอาหารแข็งแห้ง ใช้หลอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะหลุมบนอาหารแข็ง จากนั้นปิเปต Filtrate ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 40 ไมโครลิตรลงในหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หากเชื้อแบคทีเรียทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้จะเกิดวงใส (Clear zone) รอบๆหลุม

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากผลเสาวรส

จากการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเสาวรส 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เสาวรสพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*) และเสาวรสพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) โดยใช้วิธี spread plates บนอาหารแข็ง Brain heart infusion agar (BHI) และนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนไอโซเลทที่แยกได้จากเสาวรส 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์เสาวรส	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้	ชื่อไอโซเลท
พันธุ์สีม่วง	10	L2.1 L3.1 L4.1 L5.1 L6.1 L6.2 N1.1 N2.1 A1.1 และ A2.1
พันธุ์สีเหลือง	12	Y1.1 Y5.1 Y7.1 Y10.1 Y13.1 Y13.2 Y14.1 Y14.2 Y16.1 Y16.2 Y16.3 และ Y17.1

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 22 ไอโซเลทซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง BHI การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงตารางที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลท เป็นแกรมบวกเนื่องจากเซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet (ตารางภาคผนวก ค.1) และพบว่า 3 ไอโซเลท ได้แก่ L6.1 L6.2 และ A2.1 มีลักษณะโคโลนีกลมสีขาว มันวาว นูนตรงกลาง ขอบเรียบ รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์มีรูปร่างกลมเป็นคู่ ในขณะที่ 10 ไอโซเลท ได้แก่ L5.1 L2.1 L3.1 L4.1 N1.1 N2.1 A1.1 Y1.1 Y16.2 และ Y16.3 มีลักษณะโคโลนีกลมสีขาว มันวาว นูน ขอบเรียบ รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์มีรูปร่างกลมเป็นคู่ และมี 9 ไอโซเลท ได้แก่ Y7.1 Y14.1 Y14.2 Y5.1 Y10.1 Y13.1 Y13.2 Y16.1 และ Y17.1 มีโคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์มีเป็นท่อนเดี่ยว (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหาร BHI

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	ลักษณะโคโลนี	สภาวะการเจริญ
L6.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูนตรงกลาง	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
L6.2	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูนตรงกลาง	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
Y7.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y14.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y14.2	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
L5.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
L2.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
L3.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
L4.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
N1.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
N2.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
A1.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
Y5.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y10.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y13.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y13.2	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y16.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยักเป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหาร BHI (ต่อ)

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	ลักษณะโคโลนี	สภาวะการเจริญ
Y17.1	+	ท่อนเดี่ยว	โคโลนีขอบหยักเป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ
Y1.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลมสีขาว ขอบเรียบ มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
Y16.2	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลมสีขาว ขอบเรียบ มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
Y16.3	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลมสีขาว ขอบเรียบ มันวาว นูน	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน
A2.1	+	กลมเป็นคู่	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูนตรงกลาง	เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน

การเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง BHI เชื้อที่มีรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างกลมทุกไอโซเลท ได้แก่ L6.1 L6.2 L5.1 L2.1 L3.1 L4.1 N1.1 N2.1 A1.1 Y1.1 Y16.2 Y16.3 และ A2.1 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน ในขณะที่เชื้อที่มีรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างท่อน ได้แก่ Y7.1 Y14.1 Y14.2 Y5.1 Y10.1 Y13.1 Y13.2 Y16.1 และ Y17.1 สามารถเจริญในสภาวะที่มีอากาศได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (ตารางภาคผนวก ค.2) ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แล้วให้ประโยชน์แก่พืชอาศัยโดยไม่ทำอันตรายแก่พืช ดังนั้นดังนั้นความสามารถในการเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศนั้นเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (Pradeep Kumar Sharma., *et.al.*, 2013) เนื่องจากภายในเนื้อเยื่อของพืชอาจมีอากาศเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย (Reinhold-Hurek and Hurek., 1998)

4.3 ปฏิกิริยาทางชีวเคมี

4.3.1 การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส พบว่าเชื้อทั้ง 22 ไอโซเลทให้ผลบวก คือ เกิดแก๊สขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยากับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 % (w/v) ซึ่งฟองแก๊สที่เกิดขึ้นเกิดจากเอนไซม์คะตาเลสที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นตัวเร่งปฏิกริยาการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้น้ำและแก๊สออกซิเจน โดยเชื้อที่ใช้ในการทดสอบควรมีอายุอยู่ในช่วง 18-24 ชั่วโมงเพราะหากเชื้อมีอายุมากเกินไปจะให้ผลเป็น false negative และนอกจากนี้เชื้อบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เพอร็อกสิเดส (peroxidase) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เล็กน้อยโดยเกิดฟองแก๊สอย่างช้าๆซึ่งอาจทำให้ผลที่ได้เป็น false positve (Sagar Aryal., 2015)

4.3.2 ทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อ (Sugar Fermentation)

ผลการทดสอบความสามารถการหมักน้ำตาลของเชื้อในอาหาร TSI พบว่ามีเชื้อ 9 ไอโซเลท ได้แก่ L6.1 L6.2 N1.1 N2.1 A1.1 Y1.1 Y16.2 Y16.3 และ A2.1 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส

แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Fermentation) และสภาวะที่มีอากาศได้ (Oxidation) เนื่องจากทั้งบนผิวหน้าและก้นหลอดของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดในขณะที่เชื้อ 9 ไอโซเลท ได้แก่ Y7.1 Y14.1 Y14.2 Y5.1 Y10.1 Y13.1 Y13.2 Y16.1 และ Y17.1 ไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสได้เลยทั้งในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Fermentation) และสภาวะที่มีอากาศได้ (Oxidation) เนื่องจากสีของอาหารมีการเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มทั้งก้นหลอดและผิวหน้าอาหาร ส่วนเชื้ออีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ L5.1 L2.1 L3.1 และ L4.1 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสหรือซูโครสในสภาวะที่มีอากาศ (Oxidation) เท่านั้น เนื่องจากผิวหน้าของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่บริเวณก้นหลอดไม่เปลี่ยนแปลง โดยเชื้อทั้ง 22 ไอโซเลทไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เกิดขึ้น (ตารางที่ 4.3 และตารางภาคผนวก ค.3) การหมักน้ำตาลของเชื้อในอาหาร Triple sugar iron (TSI) ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาล 3 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสโดยมี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งมีสีแดงส้มที่ pH ประมาณ 7.4 แต่เมื่อเชื้อมีการสร้างกรดเกิดขึ้นจน pH ของอาหารต่ำกว่า 6 จะเปลี่ยนสี phenol red จากสีแดงส้มเป็นสีเหลือง ถ้าหากเชื้อสามารถหมักน้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Fermentation) ได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารที่ก้นหลอดจากสีแดงส้มเป็นสีเหลือง ส่วนเชื้อที่สามารถหมักน้ำตาลในสภาวะที่มีอากาศ (Oxidation) ได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ที่ผิวหน้าอาหารจากสีส้มเป็นสีเหลือง ถ้าเชื้อหมักน้ำตาลกลูโคสได้เพียงชนิดเดียวในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Fermentation) จะเปลี่ยนสีของอาหารที่ก้นหลอดจากสีแดงส้มเป็นสีเหลืองเนื่องจากเกิดกรดปริมาณน้อย ส่วนบริเวณผิวหน้าอาหารจะมีสีแดงเข้ม (K/A) แต่ถ้าเชื้อสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสและ (หรือ) ซูโครส ได้ด้วยจะทำให้ผิวหน้าของอาหารเปลี่ยนจากสีแดงส้มเป็นสีเหลืองด้วยเนื่องจากเกิดกรดปริมาณมาก (A/A) หากสีของอาหารมีการเปลี่ยนจากสีแดงส้มเป็นสีแดงเข้ม (K/K) ทั้งก้นหลอดและผิวหน้าอาหารแสดงว่าเชื้อไม่มีการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครส โดยหากมีแก๊สเกิดขึ้นจากการหมักน้ำตาล ฟองแก๊สจะแทรกอยู่ในอาหารทำให้อาหารแตกและมีช่องว่างเกิดขึ้นในอาหาร นอกจากนี้อาหาร TSI ยังสามารถทดสอบการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเป็นแก๊สไม่มีสี แต่ในอาหาร TSI จะมีเฟอรัสซัลเฟตซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนซัลไฟต์เกิดเป็นเฟอรัสซัลไฟต์ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นตะกอนสีดำ (Versalovic., *et.al.*, 2011)

4.3.3 ทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส (Gelatin Hydrolysis)

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีเชื้อ 4 ไอโซเลท ได้แก่ Y7.1 Y14.1 Y14.2 และ Y5.1 ที่สามารถย่อยเจลาตินได้ในขณะที่ 18 ไอโซเลทที่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3 และตารางภาคผนวก ค.4) โดยเอนไซม์เจลาติเนสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเจลาตินโดยสามารถเปลี่ยนเจลาตินจากสภาพแข็งไปเป็นโพลีเปปไทด์และเปลี่ยนจากโพลีเพปไทด์ไปเป็นกรดอะมิโนในสภาพเหลว เรียกว่า “liquefaction” (Pratiksha Pokhrel., 2015)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลทที่	การทดสอบทางชีวเคมี				
	คะตาเลส	TSI Agar			การย่อยเจลาติน
		slant/butt	แลคโตส/ซูโครส	กลูโคส	
L6.1	+	A/A	+	+	-
L6.2	+	A/A	+	+	-
Y7.1	+	K/K	-	-	+
Y14.1	+	K/K	-	-	+
Y14.2	+	K/K	-	-	+
L5.1	+	A/K	+	+	-
L2.1	+	A/K	+	+	-
L3.1	+	A/K	+	+	-
L4.1	+	A/K	+	+	-
N1.1	+	A/A	+	+	-
N2.1	+	A/A	+	+	-
A1.1	+	A/A	+	+	-
Y5.1	+	K/K	-	-	+
Y10.1	+	K/K	-	-	-
Y13.1	+	K/K	-	-	-
Y13.2	+	K/K	-	-	-
Y16.1	+	K/K	-	-	-
Y17.1	+	K/K	-	-	-
Y1.1	+	A/A	+	+	-
Y16.2	+	A/A	+	+	-
Y16.3	+	A/A	+	+	-
A2.1	+	A/A	+	+	-

TSI Agar : A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถหมักน้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้

A/K (Acid slant/Alkaline butt) : เชื้อสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ในสภาวะที่มีอากาศ

K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสได้

ผลจากการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เป็น 6 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม A แยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีเหลือง แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน การจัดเรียงตัวเป็นท่อนเดี่ยว โคโลนีขอบหยักเป็นฝ้าขาวแผ่ออกเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง BHI สร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดสอบบนอาหาร TSI ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสได้ สามารถย่อยเจลาตินได้ มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ Y7.1 Y14.1 Y14.2 และ Y5.1 (ตารางภาคผนวก ค.5)

กลุ่ม B แยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีเหลือง แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน การจัดเรียงตัวเป็นท่อนเดี่ยว โคโลนีขอบหยักเป็นฝ้าขาวแผ่ออกเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง BHI สร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดสอบบนอาหาร TSI ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสได้ ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ มี 5 ไอโซเลท ได้แก่ Y10.1 Y13.1 Y13.2 Y16.1 และ Y17.1 (ตารางภาคผนวก ค.5)

กลุ่มที่ C แยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นคู่ โคโลนีกลม ขอบเรียบ มันวาว นูน เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง BHI สร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดสอบบนอาหาร TSI เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและแลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ L2.1 L3.1 L4.1 และ L5.1 (ตารางภาคผนวก ค.5)

กลุ่มที่ D แยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นคู่ โคโลนีกลม ขอบเรียบ มันวาว นูนตรงกลาง สร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดสอบบนอาหารแข็ง TSI เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ L6.1 L6.2 และ A2.1 (ตารางภาคผนวก ค.5)

กลุ่มที่ E แยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นคู่ โคโลนีกลม ขอบเรียบ มันวาว นูน สร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดสอบบนอาหารแข็ง TSI เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ N1.1 N2.1 และ A1.1 (ตารางภาคผนวก ค.5)

กลุ่มที่ F แยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีเหลือง แกรมบวก รูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นคู่ โคโลนีกลม ขอบเรียบ มันวาว นูน สร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดสอบบนอาหารแข็ง TSI เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสแลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ Y1.1 Y16.2 และ Y16.3 (ตารางภาคผนวก ค.5)

เมื่อจัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยไอโซเลทที่ใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงไอโซเลทของแต่ละกลุ่มที่คัดเลือกไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้น

กลุ่ม	สายพันธุ์เสาวรส	ไอโซเลทที่นำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก
A	เหลือง	Y14.1 และ Y5.1
B	เหลือง	Y10.1
C	ม่วง	L5.1
D	ม่วง	L6.1
E	ม่วง	N1.1
F	เหลือง	Y1.1

ศึกษาการจัดเรียงตัวของเชื้อที่คัดเลือกในแต่ละกลุ่มโดยทำการย้อมด้วยสีนิโกรซิน (Nigrosin) และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของเซลล์ พบว่าการจัดเรียงตัวของเชื้อ Y14.1 Y5.1 และ Y10.1 มีลักษณะเช่นเดียวกันคือ รูปร่างเป็นท่อนเดี่ยว ส่วนเชื้อ L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 มีรูปร่างกลมอยู่ด้วยกันเป็นคู่ (diplococci) (ตารางภาคผนวก ค.6) โดยกลุ่ม A และ B มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เนื่องจากเป็นแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นท่อน สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส และเชื้อที่คัดแยกได้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ใกล้เคียงกันกับเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. (Sagar Aryal., 2016) และกลุ่ม C D E F มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสได้ มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Micrococcaceae* (Sagar Aryal., 2016)

4.4 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น

4.4.1 ความสามารถในการทนกรด

ผลการทดสอบพบว่ามีเชื้อไอโซเลท L5.1 เพียงชนิดเดียวจาก 7 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบที่ไม่สามารถทนต่อ pH 3 ได้ (ตารางที่ 4.5 และตารางภาคผนวก ค.8) การที่เชื้อสามารถทนกรดได้เนื่องจากเชื้อมีกลไกในการปั๊มโปรตอนออกจากเซลล์ทำให้สามารถรักษา pH ภายในเซลล์ไว้ใกล้เคียงกับ pH ที่เป็นกลาง (Ulrike Menzel and Gerhard Gottschalk., 1985) ซึ่งความสามารถในการทนต่อกรดเป็นหนึ่งในคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Havenaar., *et.al.*, 1992) เนื่องจากในกระเพาะอาหารของมนุษย์มีการหลั่งกรดทำให้ pH ในกระเพาะอาหารลดลงจนเท่ากับ 1.5-4 ซึ่งขึ้นอยู่กับอาหารที่รับประทาน (DeAnna., *et.al.*, 2015) โดยอาหารจะอยู่ในกระเพาะอาหารนาน 2-4 ชั่วโมง (Yin and Zheng., 2005) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จึงควรที่จะสามารถอยู่รอดได้ในกระเพาะอาหารของมนุษย์ เหตุผลที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 3 เนื่องจาก pH ในกระเพาะอาหารมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ pH 3 (F. Kong and R.P. Singh., 2006) โดย Ram Pundir และคณะ (2013) รายงานว่าโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างอาหารสามารถทนต่อ pH ได้ต่ำสุดที่ pH 3.5 แต่ไม่สามารถทนต่อ pH 3 ได้

4.4.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt)

ผลจากการทดลองพบว่าเชื้อทุกไอโซเลท ได้แก่ Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 2% (w/v) หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5 และตารางภาคผนวก ค.8) การที่เชื้อสามารถทนต่อเกลือน้ำดีเป็นเพราะเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมีความแข็งแรงทำให้ไม่ถูกทำลายโดยเกลือน้ำดีที่เป็นสารช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติในการทำให้ไขมันแตกตัว (Eugene., *et.al.*, 1996) จึงสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิด (Jin., *et.al.*, 1998) เช่น *E. coli* (Sung JY., *et.al.*, 1993) ดังนั้นความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการมีชีวิตรอดในลำไส้ของมนุษย์ ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องกับการรายงานของ Ram Pundir และคณะ (2013) ที่ทดสอบจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่แยกได้จากอาหารโดยทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0%

ตารางที่ 4.5 แสดงความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลทที่	ทดสอบคุณสมบัติ probiotic	
	pH 3	2% Bile salt
Y14.1	+	+
Y5.1	+	+
Y10.1	+	+
L5.1	-	+
L6.1	+	+
N1.1	+	+
Y1.1	+	+

คุณสมบัติการทนกรด และ 2% bile salt : + สามารถทนได้ , - ไม่สามารถทนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่มีการถ่ายเชื้อทดสอบ

4.4.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้แก่ *Esherichia coli* *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส ซึ่งทำการทดสอบโดยใช้วิธี cross streak และ agar well diffusion ผลการทดสอบโดยใช้วิธี cross streak พบว่ามีเพียงเชื้อ Y14.1 และ Y10.1 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้ ส่วนเชื้อ Y5.1 , L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 4.6 และตารางภาคผนวก ค.9) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้วิธี agar well diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลท (Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 4.6 และตารางภาคผนวก ค.10)

ตารางที่ 4.6 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค					
	Escherichia coli		*Enterobacter aerogenes*		*Listeria monocytogenes*	
	cross streak	Agar well	cross streak	Agar well	cross streak	Agar well
Y14.1	+	-	-	-	-	-
Y5.1	-	-	-	-	-	-
Y10.1	+	-	-	-	-	-
L5.1	-	-	-	-	-	-
L6.1	-	-	-	-	-	-
N1.1	-	-	-	-	-	-
Y1.1	-	-	-	-	-	-

Antagonistic activities : - : เชื้อเจริญได้ไม่มีการยับยั้ง , + : เชื้อไม่เจริญมีการยับยั้ง

ผลการยับยั้งของเชื้อ Y14.1 และ Y10.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* ได้ในวิธี cross streak แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ในวิธี agar well diffusion ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารที่ผลิตระหว่างการเจริญเติบโตมีความเข้มข้นมากพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้แต่ในวิธี agar well method การใช้น้ำเลี้ยงที่ปราศจากเชื้อมีความเข้มข้นของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญได้ซึ่งหากต้องการให้น้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ต้องทำให้สารยับยั้งมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น เช่น การสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อ (สกุลรัตน์และคณะ., 2560)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์สีม่วง (*Passiflora edulis F. edulis Sims*) และสายพันธุ์สีเหลือง (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จากเสาวรสพันธุ์สีม่วง 10 ไอโซเลทและเสาวรสพันธุ์สีเหลือง 12 ไอโซเลท จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 22 ไอโซเลทที่แยกได้จากเสาวรสสายพันธุ์สีม่วงและสายพันธุ์สีเหลือง พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ติดสีแกรมบวกทั้ง 22 ไอโซเลท มี 3 ไอโซเลท (L6.1 L6.2 และ A2.1) รูปร่างกลม ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูนตรงกลาง มี 10 ไอโซเลท (L5.1 L2.1 L3.1 L4.1 N1.1 N2.1 A1.1 Y1.1 Y16.2 และ Y16.3) รูปร่างกลม ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน โดยเชื้อรูปร่างกลมทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศไม่แตกต่างกัน และมี 9 ไอโซเลท (Y7.1 Y14.1 Y14.2 Y5.1 Y10.1 Y13.1 Y13.2 Y16.1 และ Y17.1) รูปร่างเป็นท่อน โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน โดยเชื้อที่มีรูปร่างท่อนทั้งหมดสามารถเจริญในสภาวะที่มีอากาศได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีอากาศ เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์คะตาเลสพบว่าเชื้อทั้ง 22 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้ ทดสอบการย่อยเจลาตินพบว่ามีเชื้อรูปร่างท่อน 4 ไอโซเลท (Y7.1 Y14.1 Y14.2 และ Y5.1) สามารถย่อยเจลาตินได้ ทำการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีทำให้สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มได้แก่ (Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1) และเมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทยกเว้น L5.1 ที่ไม่สามารถทนต่อ pH3 ได้ และเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทสามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 2% (v/v) ได้

ทดสอบความสามารถการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นโดยการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร สามชนิด ได้แก่ *Esherichia coli Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* โดยแบ่งเป็นการทดสอบสองวิธีคือการทดสอบแบบ Cross streak method และ Agar well diffusion พบว่าการทดสอบด้วยวิธีการ Agar well diffusion เชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิดและการทดสอบด้วยวิธี Cross streak method พบว่า มีเชื้อ 2 ไอโซเลท คือ Y14.1 และ Y10.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* ได้และเชื้อทดสอบที่เหลืออีก 5 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อการศึกษาที่ให้ได้ความชัดเจนเพิ่มขึ้นควรทำการวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุลเพิ่มเติมเพื่อยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากเสาวรสได้อย่างเจาะจงว่าสายพันธุ์ชนิดใดและเพื่อการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ได้และการพิสูจน์สายพันธุ์ที่ปลอดภัย การทนต่อกรดในระบบทางเดินอาหาร การแข่งขันการยึดเกาะผนังลำไส้จากจุลินทรีย์ก่อโรค ความสามารถการเพิ่มจำนวนใน

ระบบทางเดินอาหาร การผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคภายในระบบทางเดินอาหาร การป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรค และความสามารถในการอยู่รอดจากการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากคุณสมบัติของโพรไบโอติกเหล่านี้ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในงานศึกษาต่อไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพมหานคร.

ผศ. ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2556. โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพมหานคร.

ดร.ศิริพงศ หังสพฤกษ, ดร.ณรงคชัย พิพัฒนธนวงศ และคณะ. 2557.การปลูกเสาวรสพันธุ์หวาน. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). เชียงใหม่.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของ สมุนไพรในห้องปฏิบัติการ., **การประชุมวิชาการ สัตวแพทย์ศาสตร์ ครั้งที่ 9** . คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

นพ.วรวุฒิ เจริญศิริ, 2552. โภชนาการกับสุขภาพ. **บทความสุขภาพ ศูนย์สุขภาพกรุงเทพมหานคร**. กรุงเทพมหานคร.

ภนิดา เกื้อสุวรรณ. 2557. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลติกเพื่อใช้ผลิตผักดอง. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

มูลนิธิโครงการหลวงและสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). 2555. การปลูกเสาวรสหวาน. **มูลนิธิโครงการหลวงและสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)**. เชียงใหม่.

สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์, วัชรพงษ์ ป้องปาน และรัตนาพร อยู่พร้อม. 2560. การคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นข้าว. บทความวิจัย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กทิกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

อัจฉรา ภาวศุทธิ์, วิรัตน์ ปราบทุกข์, จิระนิล แจ่มเกิด และ ณัฐวรรณ ธรรมสุวรรณ์. 2557. ผลของรูปแบบค้างที่มีต่อปริมาณและคุณภาพผลของเสาวรสหวานพันธุ์เบอร์ 2. **แก่งเกษตร 42 ฉบับพิเศษ 3. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)**. เชียงใหม่.

Axelsson, L (1998). *Lactic acid bacteria: Classification and physiology.* **Lactic acid bacteria. Edited by Salminen, S.; von Wright, A.; & Ouwehand, A. 3rd Edition**. New York: Marcel Dekker. Inc.: 1-72.

Charteris, W.P., P.M. Kelly, L. Morelli, and J.K. Collins. 2001. Gradient diffusion antibioutc susceptibility testing of potentially probiotic *Lactobacilli.* **J. Food Prot.** 64(12): 2007-2014.

DeAnna E. Beasley, Amanda M. Koltz, Joanna E. Lambert, Noah Fierer, Rob R. Dunn. The evolution of stomach acidity and Its relevance to the human microbiome. Plos One 2015;10(7) : 1-12

Estefânia; et al. (2016) Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *lactobacillus* strains. **Front. Microbiol.** 7 : 1371.

Eugene, B.C., M.D. Sitrin and D.D. Black. 1996. Gastrointestinal Hepatobiliary and Nutritional Physiology. Lippincott-Raven Publishers, Pennsylvania.

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London,Ont. Canada.

F. Kong and R.P. Singh. ,2008, Disintegration of Solid Foods in Human Stomach, **Journal of Food Science** Vol. 73, Nr. 5.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J. Probiotics: A general view. In: The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease, B.J.B. Wood (Ed.), **Elsevier Applied Science**, London: 1992; 151–170

Hellmig S , Von Schöning F , Gadow C , Katsoulis S , Hedderich J , Fölsch UR and Stüber E., Gastric emptying time of fluids and solids in healthy subjects determined by 13C breath tests: influence of age, sex and body mass index. JGH. 2006 ; 21(12) : 1832-8

Jin, L.Z., M.Y. Ho. N. Abdullah, A.M. Ali and S. Jalaludin. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. Appl. Microbiol. 1998 ; 27: 183-185.

Lawrence X. and YuaGordon L. Amidonb. Characterization of small intestinal transit time distribution in humans. IJOP. 1998 ; 171 : 157-63

Mounyr Balouiri n, Moulay Sadiki,Saad Koraichi Ibnsouda. , Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. 2015; 6:71–9

Noel R. Kriega and Penelope J. Padgettb. Phenotypic and Physiological Characterization Methods. **Methods in microbiology.** 2011;38:15-60

Ouwehand, A. C. 1998., eds. Lactic acid bacteria:microbiology and functional aspects. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp.139-160.

Pradeep Kumar Sharma. Study of probiotic and antioxidant activity of *Lactobacillus* spp. RJPBCS 2013;4:809-19

Pratiksha Pokhrel. Gelatin hydrolysis test-principle, uses, media, procedure and result [Internet] . 2015 [cited 2018 March 25] Available from : http: / / www. microbiologynotes. com/ gelatin- hydrolysis- test- principle- uses- media- procedure-and-result

Ram Kumar Pundir, Satish Rana, Neha Kashyap and Amandeep Kaur. 2013. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. **Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 3.** pp. 085-093.

Rania Aydi Ben Abdallah, Sonia Mokni-Tlili, Ahlem Nefzi, Hayfa Jabnoun-Khiareddine and Mejda Daami-Remadi., Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from Nicotiana glauca -organs. **Biological Control**. 2016;97:80–8

Rosenberg, M; Gutnick, D. ; & Rosenberg, E. (1980) . Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell- surface hydroprobicity. **FEMS Microbiol.** Lett. 9: 29-33

Sagar Aryal. Catalase test- principle, uses, procedure, result interpretation with precautions [Internet] . 2015 [cited 2018 March 25] . Available from : https: / / microbiologyinfo. com/ catalase- test- principle- uses- procedure- result- interpretation-with-precautions

Stanton, C., et al. (2001). Market potential for probiotics, Am J Clin Nutr, 73, 476S-483S.

Sung JY , Shaffer EA and Costerton JW. Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens. Effects of hydrophobicity of the molecule and in the presence of phospholipids. Dig Dis Sci. 1993;38(11):2104-12

Tambekar, D. H. and Bhutada, S. A. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. **Science and Technology**. 2010; 2: 82-88.

Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), **Manual of clinical microbiology, 10th ed, vol 2**. ASM Press, Washington, DC.

W.J. Kelly, R.V. Asmundson, and C.M. Huang. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **International Journal of Food Microbiology 33.** 209-218.

Yakult Central Institute for Microbiological Research. 1998. Lactobacillus casei strain Shirota. Tokyo, Japan: Yakult Honsha Company Ltd.

Yin Q and Zheng Q.,2005 Isolation and identification of the dominant Lactobacillus in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis. JBB 2005 ; 99 : 68-71

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI)

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

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

2. อาหารแข็ง Triple Sugar Iron (TSI)

Meat Extract B#	3.0	กรัม
Yeast Extract	3.0	กรัม
Casein enzymic hydrolysate	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Ferrous Sulfate	0.2	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Sodium Thiosulfate	0.3	กรัม
Agar	12.0	กรัม
Phenol Red	0.024	กรัม

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

3. อาหารทดสอบการใช้น้ำตาล Glucose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร

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

4. อาหารทดสอบการใช้น้ำตาล Lactose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร

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

5. อาหารทดสอบการใช้น้ำตาล Sucrose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร

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

6. อาหาร Nutrient gelatin

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 6.8 ± 0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7. อาหารทดสอบการทนกรด

เตรียมอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 5นอร์มอล จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 3 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8. อาหารทดสอบการทนกรด

เตรียมอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่เติมเกลือน้ำดี (Bile salt)ให้มีความเข้มข้น 2 % (w/v) ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก

ข

การเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายคริสตัลไวโอเลต

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

ละลายส่วนผสมของ A และ B ให้เข้ากัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งสองส่วนให้เข้ากัน แล้วกรองและเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายไอโอดีน (Gram's iodine solution)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย Iodine และ Potassium iodine ในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อยให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายซาฟรานินโอ

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl aicohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

เตรียม stock solution ของซาฟรานินโอ โดยผสมทั้งสองส่วนให้เข้ากัน จากนั้นกรอง เมื่อจะใช้ให้เจือจางเป็น 1:10 โดยเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในขวดสีชา

4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

5. สารละลายไฮโดรคลอริค 5 นอร์มอล

ตวงกรดไฮโดรคลอริค 36% (w/v) 42.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

6. สารละลาย Bromthymol blue 0.2%

ชั่ง Bromthymol blue 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างดี เก็บไว้ในขวดสีชา

7. สารละลาย McFarland Standard No. 0.5

1% $BaCl_2$	0.05	มิลลิลิตร
1% H_2SO_4	9.95	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน เมื่อละลายเชื้อแบคทีเรียจนมีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 จะมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/ml

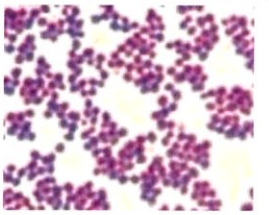
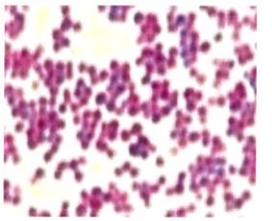
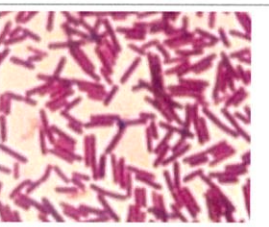
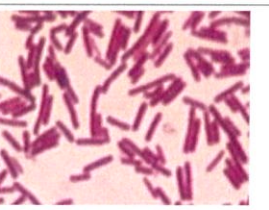
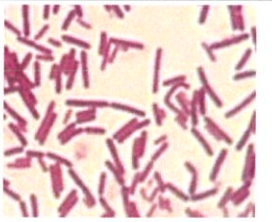
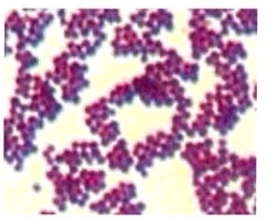
ภาคผนวก

ค

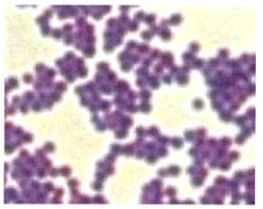
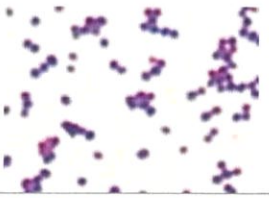
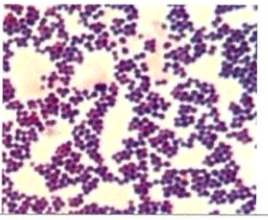
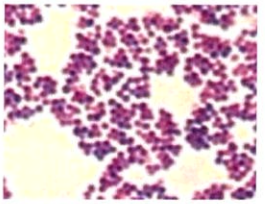
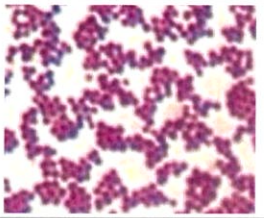
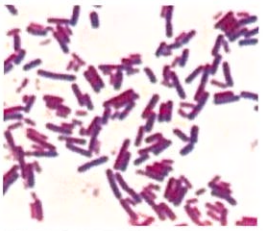
ตารางแสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น

ภาคผนวก ค

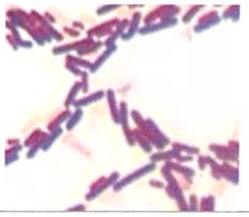
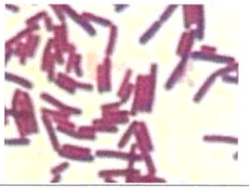
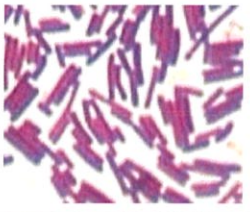
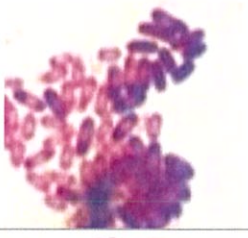
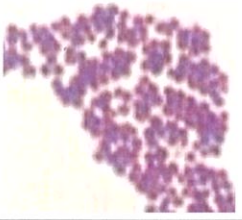
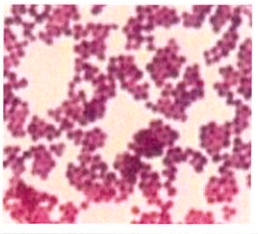
ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลทที่	แกรม	รูปร่าง	ภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์
L6.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
L6.2	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
Y7.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y14.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y14.2	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
L5.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	

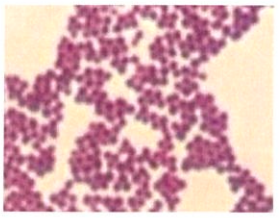
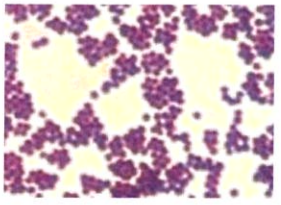
ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลทที่	แกรม	รูปร่าง	ภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์
L2.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
L3.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
L4.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
N1.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
N2.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
A1.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
Y5.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	

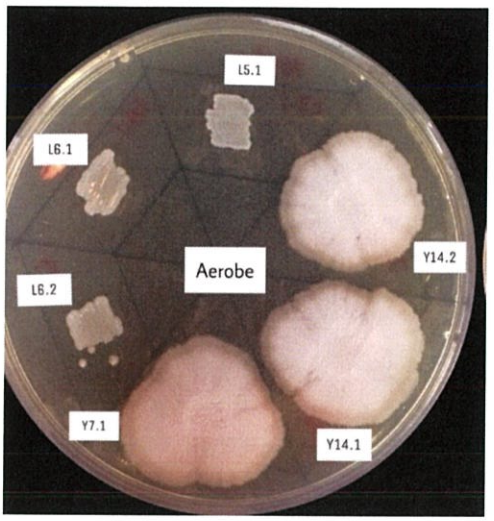
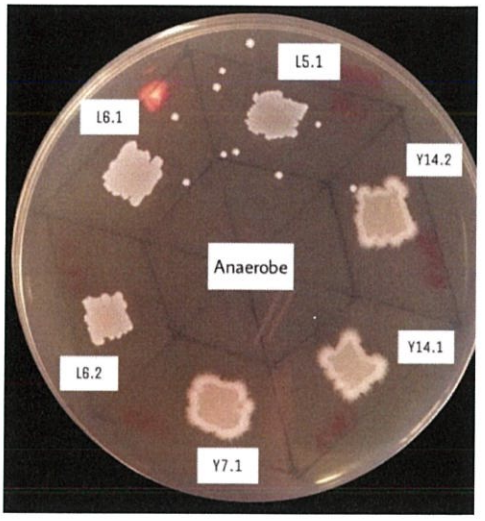
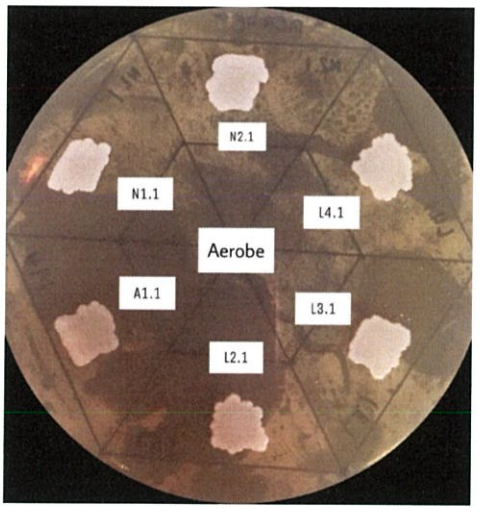
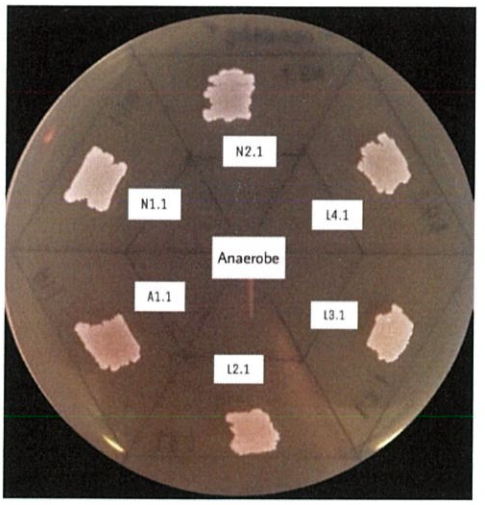
ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลทที่	แกรม	รูปร่าง	ภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์
Y10.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y13.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y13.2	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y16.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y17.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	ท่อน	
Y1.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
Y16.2	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	

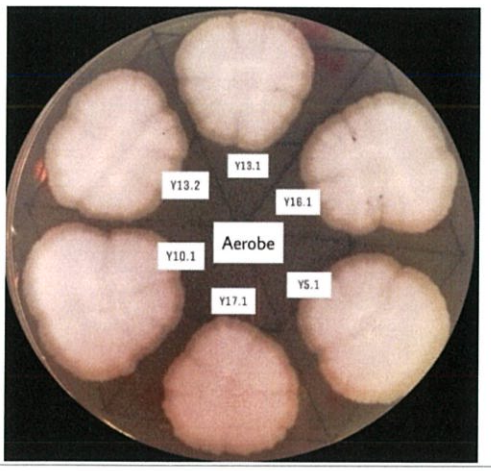
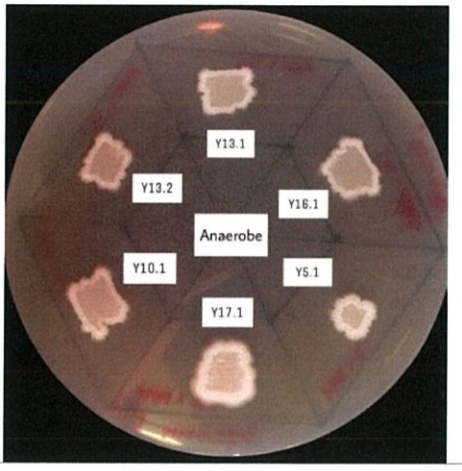
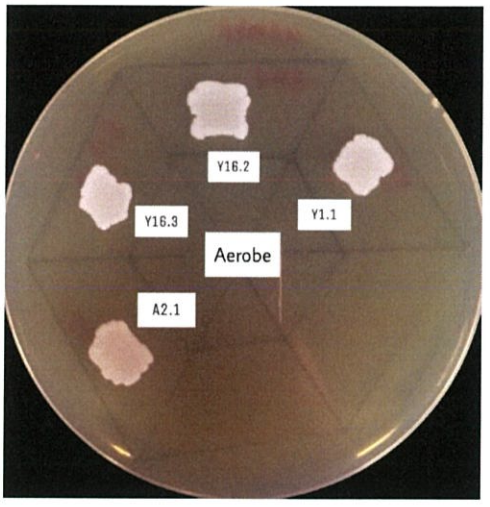
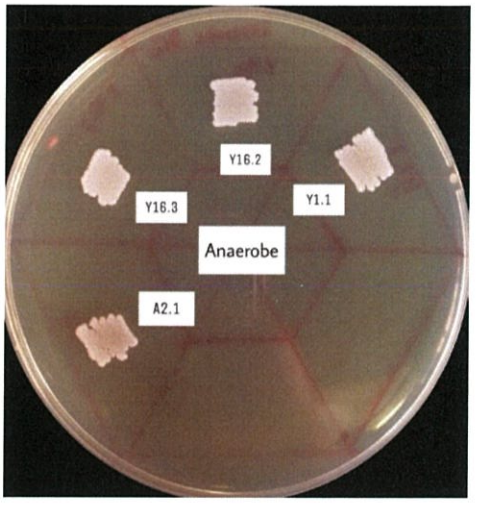
ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลทที่	แกรม	รูปร่าง	ภาพการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์
Y16.3	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	
A2.1	+ ติดสีม่วงของ crystal violet	กลม	

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงภาพเปรียบเทียบการเจริญบนอาหารแข็ง BHI ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

มีอากาศ	ไม่มีอากาศ
	
	

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงภาพเปรียบเทียบการเจริญบนอาหารแข็ง BHI ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

	มีอากาศ	ไม่มีอากาศ
		
		

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงภาพการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	TSI Agar
A1.1	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
A2.1	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
L2.1	 A/K (Acid slant/Alkaline butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ในสภาวะที่มีอากาศโดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
L3.1	 A/K (Acid slant/Alkaline butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ในสภาวะที่มีอากาศโดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงภาพการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลท	TSI Agar
L4.1	A/K (Acid slant/Alkaline butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ในสภาวะที่มีอากาศโดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
L5.1	A/K (Acid slant/Alkaline butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้ในสภาวะที่มีอากาศโดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
L6.1	A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
L6.2	A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงภาพการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลท	TSI Agar
N1.1	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
N2.1	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
Y1.1	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
Y16.2	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงภาพการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลท	TSI Agar
Y16.3	 A/A (Acid slant/Acid butt) : เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคส แลคโตสและ (หรือ) ซูโครสได้โดยไม่มีการสร้างแก๊สและไฮโดรเจนซัลไฟต์
Y5.1	 K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y7.1	 K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y10.1	 K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y13.1	 K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงภาพการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลท	TSI Agar
Y13.2	K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y14.1	K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y14.2	K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y16.1	K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้
Y17.1	K/K (Alkaline slant/Alkaline butt) : เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสได้

ตารางภาคผนวก ค.4 แสดงภาพการทดสอบการย่อยเจลาตินของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	ผลการทดสอบ	ภาพการย่อยเจลาติน
Y5.1	ย่อยเจลาตินได้	
Y7.1	ย่อยเจลาตินได้	
Y14.1	ย่อยเจลาตินได้	
Y14.2	ย่อยเจลาตินได้	
A1.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	
A2.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	

ตารางภาคผนวก ค.4 แสดงภาพการทดสอบการย่อยเจลาตินของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	ผลการทดสอบ	ภาพการย่อยเจลาติน
L2.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
L3.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
L4.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
L5.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
L6.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
L6.2	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	

ตารางภาคผนวก ค.4 แสดงภาพการทดสอบการย่อยเจลาตินของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	ผลการทดสอบ	ภาพการย่อยเจลาติน
N1.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	
N2.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	
Y1.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	
Y10.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	
Y13.1	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	
Y13.2	ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้	

ตารางภาคผนวก ค.4 แสดงภาพการทดสอบการย่อยเจลาตินของเชื้อที่แยกได้จากเสาวรส

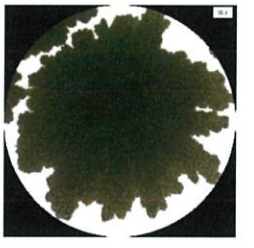
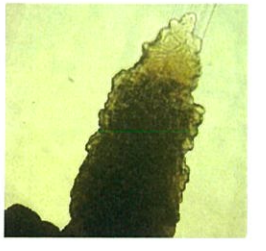
ไอโซเลท	ผลการทดสอบ	ภาพการย่อยเจลาติน
Y16.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
Y16.2	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
Y16.3	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	
Y17.1	ไม่สามารถ ย่อยเจลาตินได้	

ตารางภาคผนวก ค.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของเชื้อในแต่ละกลุ่ม

ไอโซเลท	กลุ่ม	ลักษณะโคโลนี	การจัดเรียงตัว	คุณลักษณะแสดงความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น							
				pH 3	2% Bile salt	Antibacterial activity					
						E. coli		*Enterobacter aerogenes*		*Listeria monocytogenes*	
						cross streak	Agar well	cross streak	Agar well	cross streak	Agar well
Y14.1	A	กลม มันวาว นูน ขอบเรียบ	ท่อนเดี่ยว	+	+	+	-	-	-	-	-
Y5.1	B	โคโลนีใหญ่ขอบหยัก ฝ้าขาว แผ่ออก ไม่นูน	ท่อนเดี่ยว	+	+	-	-	-	-	-	-
Y10.1	C	โคโลนีใหญ่ขอบหยัก ฝ้าขาว แผ่ออก ไม่นูน	ท่อนเดี่ยว	+	+	+	-	-	-	-	-
L5.1	D	กลม มันวาว นูน ขอบเรียบ	diplococci	-	+	-	-	-	-	-	-
L6.1	E	กลม มันวาว นูนตรงกลาง ขอบเรียบ	diplococci	+	+	-	-	-	-	-	-
N1.1	F	กลม มันวาว นูน ขอบเรียบ	diplococci	+	+	-	-	-	-	-	-
Y1.1	G	กลม มันวาว นูน ขอบเรียบ	diplococci	+	+	-	-	-	-	-	-

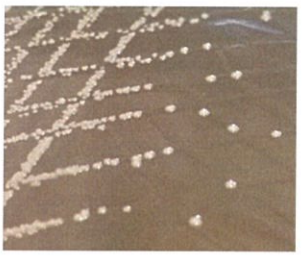
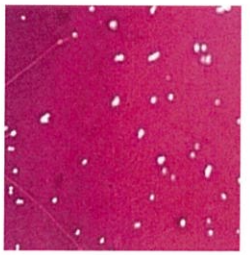
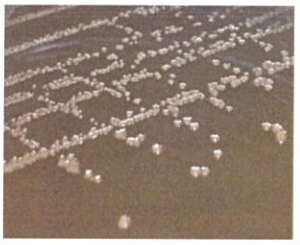
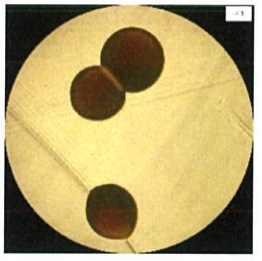
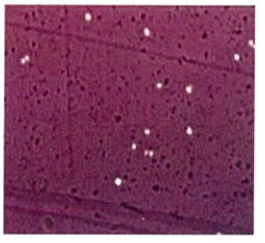
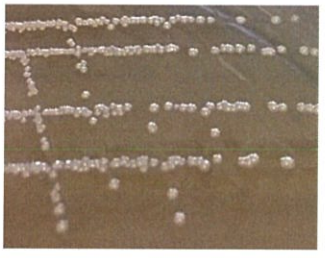
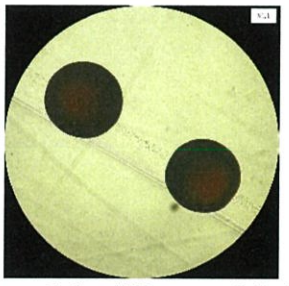
การทนต่อกรด และ 2%bile salt : + สามารถทนได้ , - ไม่สามารถทนได้ Antagonistic activities : - : ไม่มีการยับยั้ง , + : มีการยับยั้ง

ตารางภาคผนวก ค.6 แสดงภาพลักษณะโคโลนีและการจัดเรียงตัวของเชื้อแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร BHI	ขอบโคโลนี	การจัดเรียงตัว
Y14.1			
	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	รูปท่อนเดี่ยว
Y5.1			
	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	รูปท่อนเดี่ยว
Y10.1			
	โคโลนีขอบหยัก เป็นฝ้าขาวแผ่ออก ไม่นูน	ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	รูปท่อนเดี่ยว

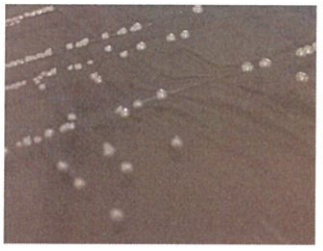
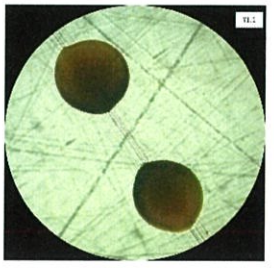
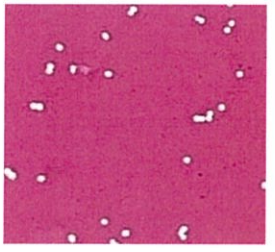
ตารางภาคผนวก ค.6 แสดงภาพลักษณะโคโลนีและการจัดเรียงตัวของเชื้อแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากเสาวรส

(ต่อ)

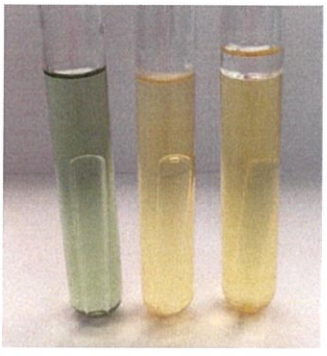
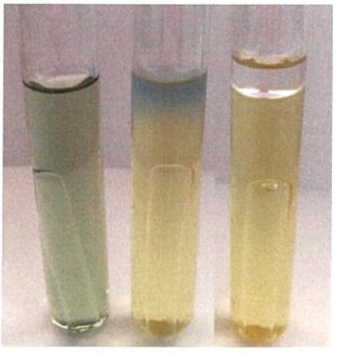
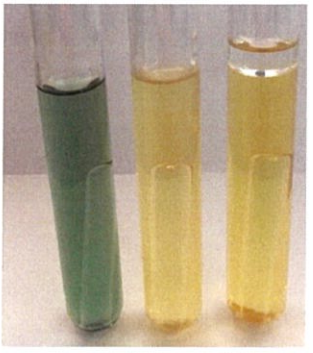
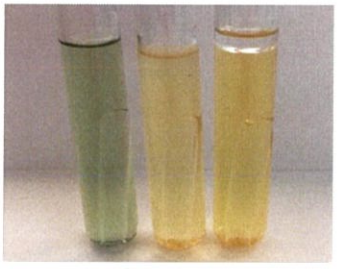
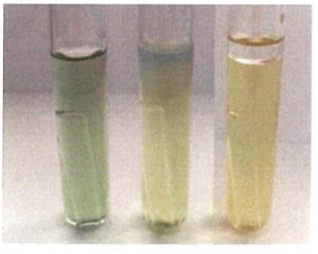
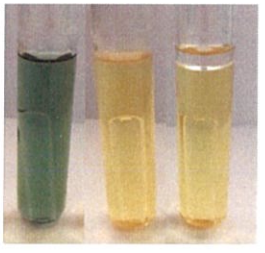
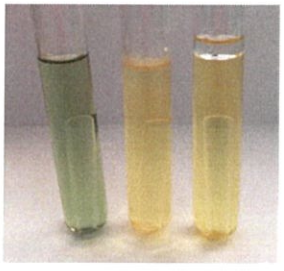
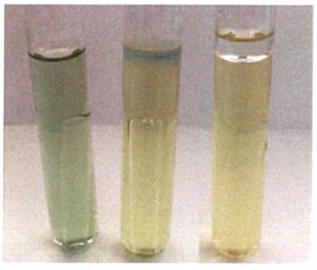
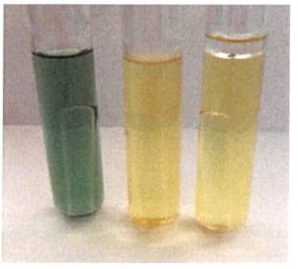
ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร BHI	ขอบโคโลนี	การจัดเรียงตัว
L5.1	 โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	 รูปร่างกลมเป็นคู่
L6.1	 โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูนตรงกลาง	 ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	 รูปร่างกลมเป็นคู่
N1.1	 โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	 ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	รูปร่างกลมเป็นคู่

ตารางภาคผนวก ค.6 แสดงภาพลักษณะโคโลนีและการจัดเรียงตัวของเชื้อแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากเสาวรส

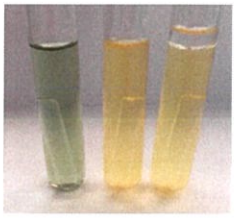
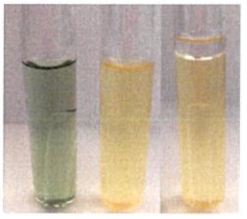
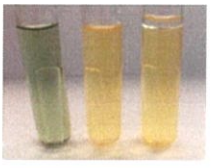
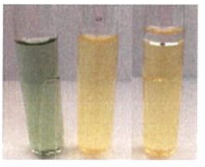
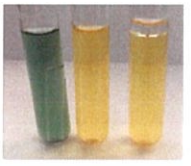
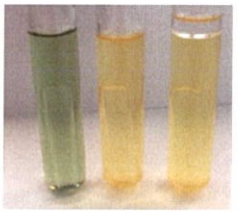
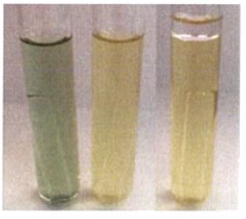
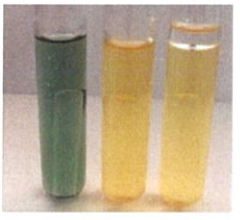
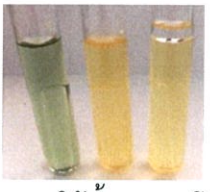
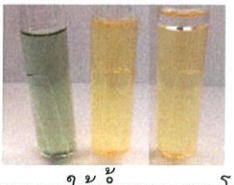
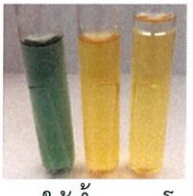
(ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร BHI	ขอบโคโลนี	การจัดเรียงตัว
Y1.1			
	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มันวาว นูน	ภาพขอบโคโลนีได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40X	รูปร่างกลมเป็นคู่

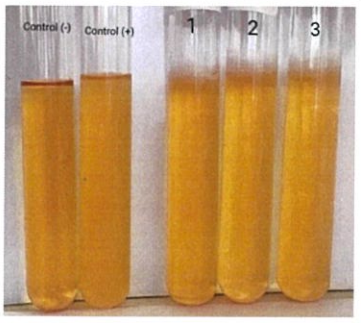
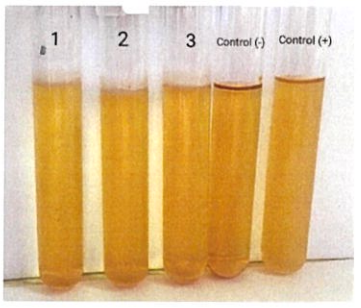
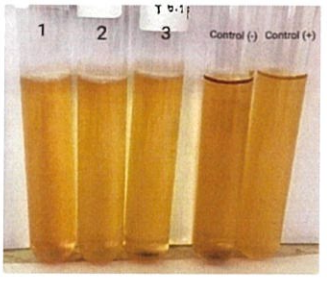
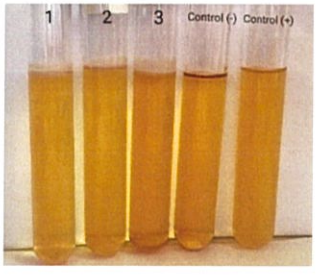
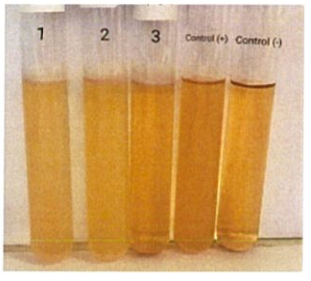
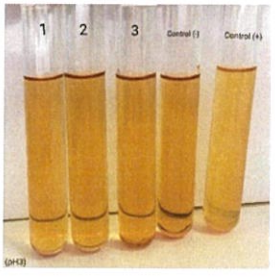
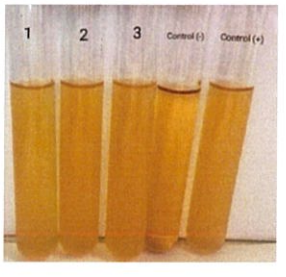
ตารางภาคผนวก ค.7 แสดงภาพการทดสอบการใช้น้ำตาลกูโคส แลคโตสและซูโครสของเชื้อแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	กลูโคส	แลคโตส	ซูโครส
Y14.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ
Y5.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ
Y10.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

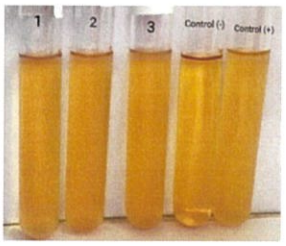
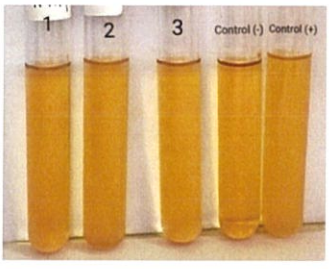
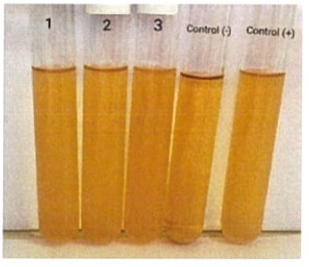
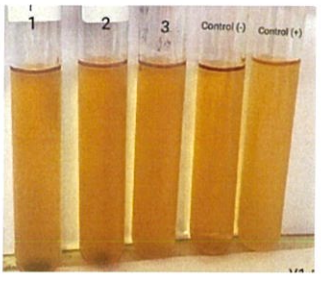
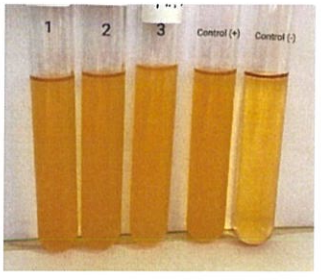
ตารางภาคผนวก ค.7 แสดงภาพการทดสอบการใช้น้ำตาลกูโคส แลคโตสและซูโครสของเชื้อแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลท	กลูโคส	แลคโตส	ซูโครส
L5.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ
L6.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ
N1.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ
Y1.1	 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีมากทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

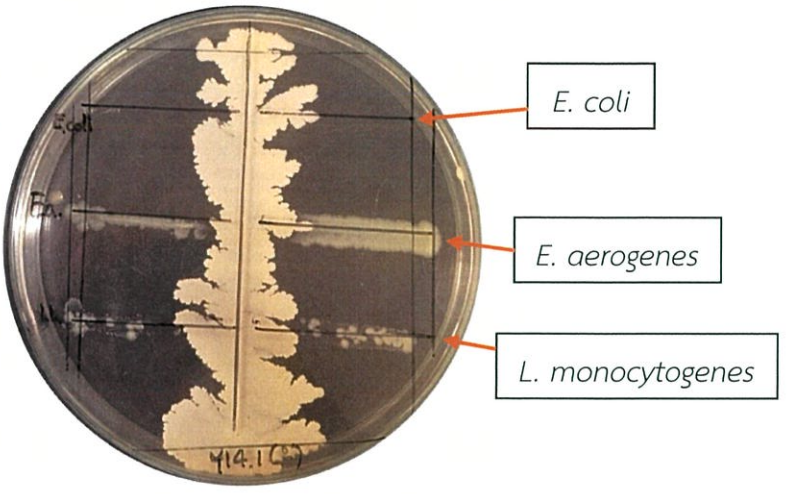
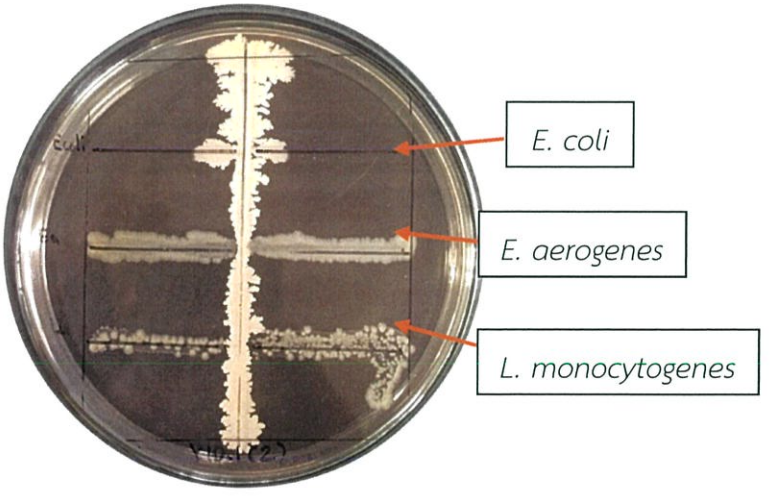
ตารางภาคผนวก ค.8 แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส

ไอโซเลท	pH 3	2% bile salt
Y14.1		
	สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้
Y5.1		
	สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้
Y10.1		
	สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้
L5.1		
	ไม่สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้

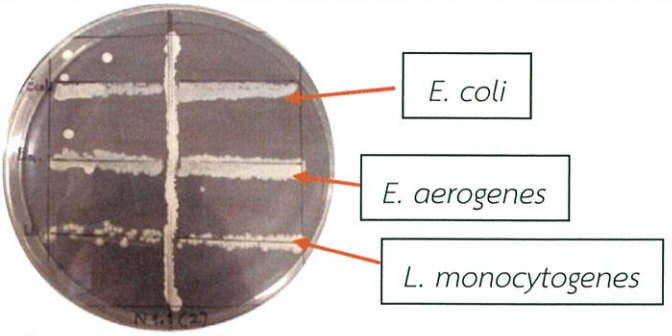
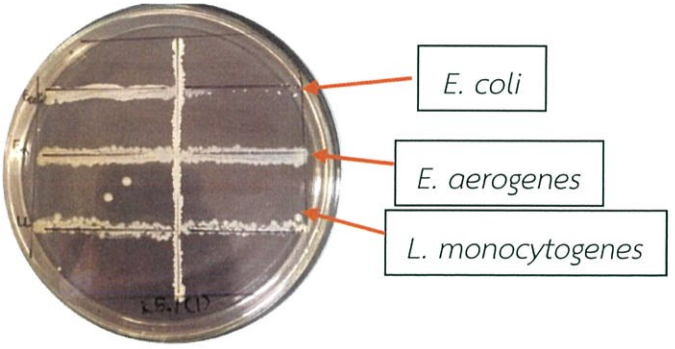
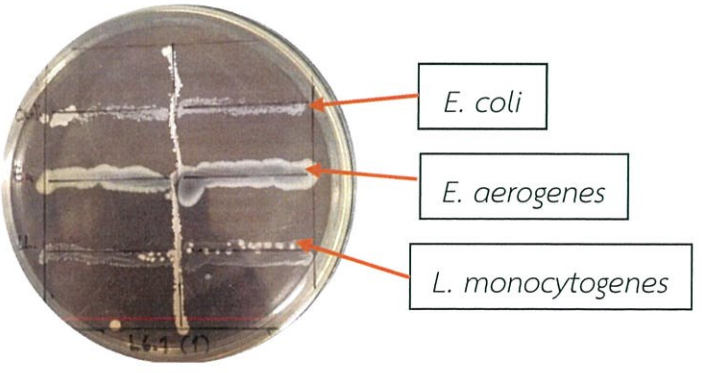
ตารางภาคผนวก ค.8 แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส (ต่อ)

ไอโซเลท	pH 3	2% bile salt
L6.1		
	สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้
N1.1		
	สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้
Y1.1		
	สามารถทนกรดได้	สามารถทนเกลือน้ำดีได้

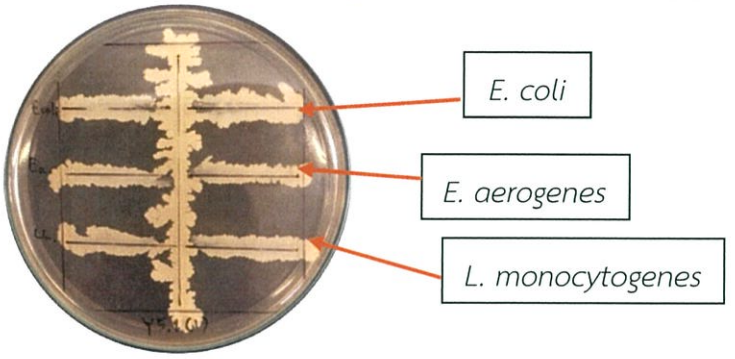
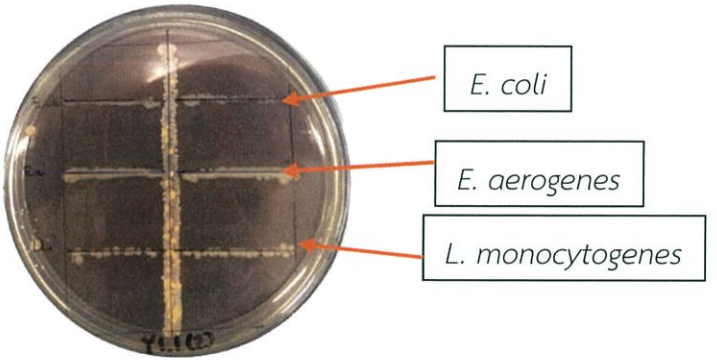
ตารางภาคผนวก ค.9 แสดงภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี cross streak

ไอโซเลทที่	ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค
Y14.1	 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* ได้ แต่ไม่สามารถยับยังการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes*
Y10.1	 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* ได้ แต่ไม่สามารถยับยังการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes*

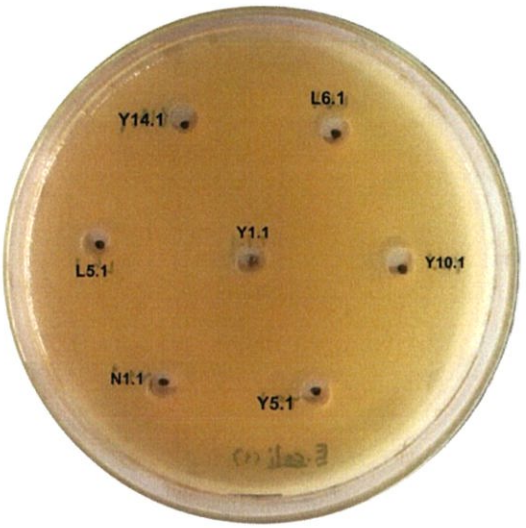
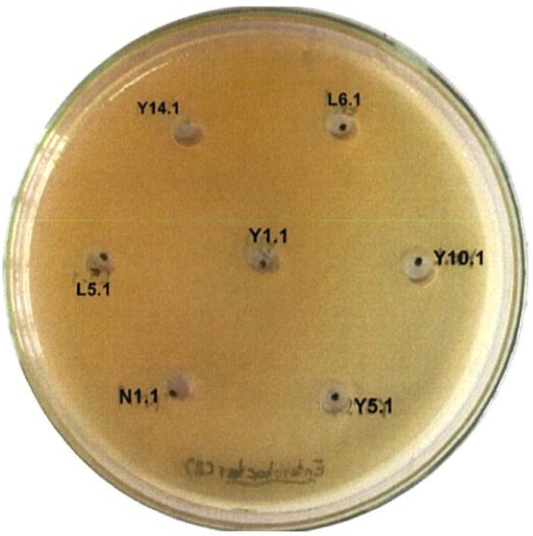
ตารางภาคผนวก ค.9 แสดงภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี cross streak (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค
N1.1	 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้
L5.1	 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้
L6.1	 วิธี cross streak ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้

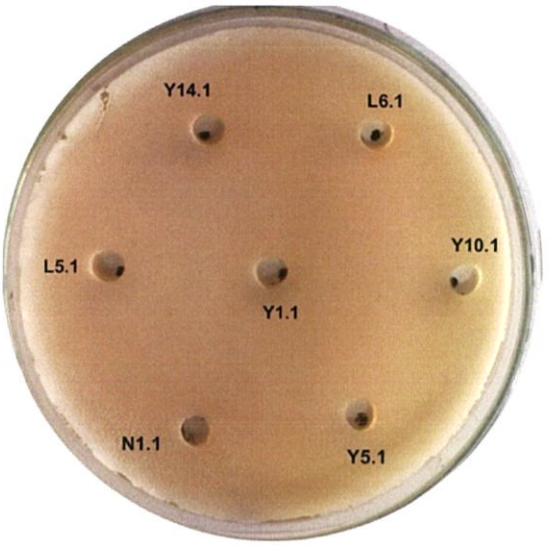
ตารางภาคผนวก ค.9 แสดงภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี cross streak (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค
Y5.1	 วิธี cross streak ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้
Y1.1	 วิธี cross streak ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* *Enterobacter aerogenes* และ *Listeria monocytogenes* ได้

ตารางภาคผนวก ค.10 แสดงภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส โดยวิธี agar well diffusion

จุลินทรีย์ก่อโรค	ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส
Esherichia coli	 น้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อไอโซเลท Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Esherichia coli* ได้
Enterobacter aerogenes	 น้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อไอโซเลท Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ได้

ตารางภาคผนวก ค.10 แสดงภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส โดยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

จุลินทรีย์ก่อโรค	ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกได้จากเสาวรส
Listeria monocytogenes	 น้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อไอโซเลท Y14.1 Y5.1 Y10.1 L5.1 L6.1 N1.1 และ Y1.1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แบบฟอร์มการตรวจสอบการคัดลอกผลงานทางวิชาการ

ข้าพเจ้า นายณัฐนนท์ บุณยะกมล รหัสนักศึกษา 57050827

นางสาวณัฐวิภา บุตรโพธิ์ รหัสนักศึกษา 57050828

นายศตวรรษ แฝงมนต์ รหัสนักศึกษา 57050895

ระดับ ปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ ได้เสนอโครงงานพิเศษหัวข้อเรื่อง

ชื่อภาษาไทย การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสและการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นโพรไบโอติก

ชื่อภาษาอังกฤษ Isolation of Endophytic Bacteria From Passion Fruit and Determination of Their Probiotic Potential

ได้ตรวจเช็คผลงานวิชาการข้างต้นแล้ว ในภาคเรียนที่ 2 วันที่ 1 เดือน กรกฎาคม ปี 2561

โดยใช้โปรแกรม อักขราวิสุทธิ์ ตรวจสอบพบความเหมือนของเนื้อหา 0.43 %

โดยอาจารย์ที่ปรึกษายอมรับได้ว่าไม่ได้คัดลอกข้อความที่มีสาระสำคัญจากผลงานของผู้อื่น

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ณัฐนนท์ บุณยะกมล.....

(นายณัฐนนท์ บุณยะกมล)

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ณัฐวิภา บุตรโพธิ์.....

(นางสาวณัฐวิภา บุตรโพธิ์)

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ศตวรรษ แฝงมนต์.....

(นายศตวรรษ แฝงมนต์)

วันที่ 2 เดือน กรกฎาคม ปี 2561

ได้รับความเห็นชอบจากอาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

(ดร.กานต์ วงศาริยะ)

วันที่ 2 เดือน กรกฎาคม ปี 2561